

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Natália Calixto Miranda Santos

ESTUDO DA PROTEÍNA ESPERMÁTICA EPPIN: ASPECTOS CELULARES E ESTRUTURAIS

Natália Calixto Miranda Santos

ESTUDO DA PROTEÍNA ESPERMÁTICA EPPIN: ASPECTOS CELULARES E ESTRUTURAIS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biotecnologia, Campus de Botucatu, UNESP,
para obtenção de Bacharel em Ciências Biomédicas.

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

Co-orientador: Dr. Antoniel Augusto S. Gomes

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

Santos, Natália Calixto Miranda.

Estudo da proteína espermática EPPIN : aspectos celulares e estruturais / Natália Calixto Miranda Santos. - Botucatu, 2023

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências biomédicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Erick José Ramo da Silva

Coorientador: Antoniel Augusto Severo Gomes

Capes: 20804008

1. Espermatozoides. 2. Motilidade espermática.
3. Anticoncepção. 4. Ciências médicas.

Palavras-chave: Contracepção masculina; Espermatozoide; Interação ligante-receptor; Modelagem molecular; Motilidade espermática.

Faça o teu melhor, na condição que você tem,
enquanto você não tem condições melhores,
para fazer melhor ainda.

Mario Sergio Cortella

Auxílio Financeiro

PIBIC - Ações Afirmativas – Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPe)
(Processo nº 3435)

RESUMO

Em um contexto global, aproximadamente metade das gestações anuais não são planejadas pelos casais, e em 50% dos casos culminam em aborto eletivo. Novas estratégias contraceptivas masculinas promoverão planejamento familiar e o compartilhamento da responsabilidade do controle de natalidade entre os parceiros. Eventos associados à função espermática, como a motilidade e a capacitação emergem como fontes de alvos para contracepção masculina não-hormonal. A proteína espermática EPPIN (Epididymal protease inhibitor), estruturada em dois domínios inibidores de protease (WFDC e Kunitz), atua como centro para interações proteína-proteína (IPPs) na superfície do espermatozoide. Por exemplo, a EPPIN interage com a proteína do plasma seminal SEMG1 (seminogenina-1), resultando na inibição temporária da motilidade espermática após a ejaculação. Além disso, pequenos compostos experimentais orgânicos, EP055 e EP012, ao interagir com a EPPIN promoveram a redução da motilidade espermática. Esses resultados elevaram a EPPIN a um dos mais promissores alvos farmacológicos para contracepção masculina. Estudos recentes identificaram as proteínas espermáticas AKAP4 (proteína âncora 4 da proteína quinase A) e GAPDHS (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) como novas potenciais parceiras da EPPIN, ampliando o leque de funções de suas IPPs. Entretanto, pouco se conhece sobre a distribuição e colocalização da EPPIN com a AKAP4 e GAPDHS durante a maturação espermática pós-testicular, além de ser pouco explorada do ponto de vista estrutural com potenciais ligantes endógenos ou exógenos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi investigar potenciais IPPs da EPPIN e seus sítios de ligação passíveis de intervenção farmacológica, visando aplicações na contracepção masculina. Utilizando ensaios de imunofluorescência, observamos a presença da EPPIN, GAPDHS e AKAP4 no espermatozoide murino durante a maturação pós-testicular *in vivo* e *in vitro*. Observamos a colocalização da EPPIN e com a GAPDHS e AKAP4 essencialmente na peça intermediária e principal do flagelo do espermatozoide, indicando um potencial papel em eventos que governam a motilidade espermática. No estudo estrutural, aplicamos técnicas de modelagem molecular para explorar diferentes conformações da EPPIN. Apesar da baixa variação dos ângulos entre os domínios WFDC (N-terminal) e Kunitz (C-terminal), a EPPIN apresentou conformações abertas, intermediárias e fechadas bem definidas. Os ensaios de ancoragem molecular demonstraram que a conformações intermediárias apresentaram melhor acomodação do EP055 no sítio de ligação da EPPIN, ressaltando resíduos dos domínios WFDC e Kunitz na interface de contatos do complexo. Em conjunto, nosso estudo esclarece que a EPPIN e suas proteínas parceiras permanecem associadas ao espermatozoide durante seu percurso até a fertilização. Ainda, sugerimos que a estrutura da EPPIN apresenta estado conformacional favorável para a interação de ligantes em seu sítio de ligação, sustentando a hipótese de que essas proteínas e ligantes possuem papel essencial na fertilidade.

Palavras-chave: Contracepção masculina. Espermatozoides. Motilidade espermática. Interação ligante-receptor. Modelagem molecular.

ABSTRACT

In a global context, approximately half pregnancies per year are unplanned by couples, and in 50% of cases they culminate in elective abortion. New male contraceptive strategies will encourage family planning and the sharing of birth control responsibility between partners. Events associated with sperm function, such as sperm motility and capacitation, emerge as sources of targets for non-hormonal male contraception. The sperm protein EPPIN (Epididymal protease inhibitor), structured in two protease inhibitor domains (WFDC and Kunitz), acts as a central hub for protein-protein interactions (PPIs) on the sperm surface. For example, EPPIN interacts with the seminal plasma protein SEMG1 (seminogenin-1), resulting in temporary inhibition of sperm motility after ejaculation. In addition, small organic experimental compounds, EP055 and EP012, when interacting with EPPIN promote sperm motility reduction. These results have elevated EPPIN to one of the most promising pharmacological targets for male contraception. Recent studies have identified the sperm proteins AKAP4 (A-kinase anchor protein 4) and GAPDHS (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) as new potential partners of EPPIN, expanding PPIs functions. However, little is known about the distribution and colocalization of EPPIN with AKAP4 and GAPDHS during post-testicular sperm maturation from a structural point of view, as well as their potential endogenous or exogenous ligands. Therefore, this study aimed to investigate potential EPPIN PPIs and their binding sites used in pharmacological intervention, purposing applications in male contraception. Using immunofluorescence assays, we observed the presence of EPPIN, GAPDHS and AKAP4 in murine spermatozoa during post-testicular maturation *in vivo* and *in vitro*. We observed colocalization of EPPIN with GAPDHS and AKAP4 essentially in the midpiece and main piece of the sperm flagellum, indicating a potential role in events that regulate sperm motility. In the structural study, we applied molecular modeling strategies to explore different EPPIN conformations. Despite the low angle variation between the WFDC (N-terminal) and Kunitz (C-terminal) domains, EPPIN presented well-defined open, intermediate, and closed conformations. Molecular docking assays showed intermediate conformations as better accommodation of EP055 in the EPPIN binding site, emphasizing residues from the WFDC and Kunitz domains in the contact interface of the complex EPPIN/EP055. Altogether, our study clarifies that EPPIN and its partner proteins remain associated with spermatozoa during its journey to fertilization. Furthermore, we suggest that the EPPIN structure presents a favorable conformational state for the interaction of the ligands in its binding site, supporting the hypothesis that these proteins and ligands play an essential role in fertility.

Keywords: Male contraception. Spermatozoa. Sperm motility. Ligand-receptor interaction. Molecular modeling.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. METODOLOGIA	13
2.1 Delineamento experimental	13
2.1.1 Primeira parte	13
2.1.2 Segunda parte	13
2.2 Metodologias para a primeira parte do estudo	14
2.2.1 Animais	14
2.2.2 Coleta de espermatozoides maduros da cauda do epidídimo e capacitação <i>in vitro</i>	14
2.2.3 Acasalamento e coleta dos espermatozoides ejaculados	14
2.2.4 Ensaios de imunofluorescência	15
2.3 Metodologias da segunda parte do estudo	15
2.3.1 Modelo da EPPIN e estrutura do EP055	15
2.3.2 Montagem do sistema de simulação de dinâmica molecular	16
2.3.3 Cálculo dos modos normais (MN) e dinâmica molecular por modos normais excitados (DM-MNE)	17
2.3.4 Atracamento Molecular.....	17
2.4 Análise dos resultados	18
3. RESULTADOS	19
3.1 Distribuição e colocalização das proteínas espermáticas EPPIN, GAPDHS e AKAP4 no espermatozoide coletado da cauda do epidídimo capacitado ou não <i>in vitro</i>	19
3.2 Distribuição e colocalização das proteínas EPPIN, GAPDHS e AKAP4 no espermatozoide ejaculado coletado de diferentes porções do trato reprodutor feminino	20
3.3 Descrição da sequência e estrutura predita da EPPIN humana pela plataforma AlphaFold.....	21
3.4 Abertura da EPPIN e exposição da sequência de asparagina por DM-NME.....	22
3.5 Interações do complexo EPPIN/EP055 por Docking Molecular	24
DISCUSSÃO	31
CONCLUSÃO	35
ANEXO I	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

1. INTRODUÇÃO

Estimativas globais apontam que das 213 milhões de gestações que ocorrem por ano, aproximadamente 85 milhões não são programadas pelos casais; dentre estas, 50% são interrompidas por procedimentos de aborto eletivo (Sedgh, Singh e Hussain, 2014). Vale destacar que cerca de 20 milhões desses abortos são realizados em condições sanitárias insalubres, ou por administração incorreta de medicamentos (Åhman *et al.*, 2011), podendo levar à morte ou a graves problemas para as mulheres que passam por esses procedimentos. Estudos demonstram que prevenir gestações indesejadas pode evitar 25% de mortes maternas associadas a problemas na gestação (Åhman *et al.*, 2011). Nesse contexto, a promoção do planejamento familiar pode contribuir com as escolhas dos casais e suas famílias (Sedgh, Singh e Hussain, 2014).

Dentro da demanda por novas alternativas contraceptivas, existe urgência por novos métodos masculinos para controle da natalidade, cujas opções atuais estão restritas ao preservativo ou à vasectomia (Martin *et al.*, 2000; Roth e Amory, 2016), em contraste com as diversas estratégias contraceptivas femininas disponíveis no mercado (Aitken *et al.*, 2008). Portanto, novas estratégias farmacológicas que suprimam a fertilidade masculina de forma temporária e segura têm potencial de promover maior responsabilidade e autonomia do homem nas escolhas associadas ao planejamento familiar e reduzir o fardo das mulheres quanto aos riscos associados à contracepção (Roth e Amory, 2016). Diante dessa necessidade, estudos envolvendo alvos hormonais e não-hormonais para a contracepção masculina estão em desenvolvimento pré-clínico ou clínico (O’Rand, Silva e Hamil, 2016; Roth e Amory, 2016).

A escolha de alvos contraceptivos é baseada em eventos cruciais para a reprodução, como as etapas de maturação pós-testicular do espermatozoide conhecidas como: maturação espermática no epidídimo e capacitação, que são importantes para o potencial fértil dos espermatozoides, cujo bloqueio ou perda da função resulta na infertilidade masculina. A maturação dos espermatozoides no epidídimo é essencial para transformá-los em células móveis, aptas para a segunda e última fase de maturação pós-testicular: a capacitação. Esta ocorre no sistema genital feminino, promovendo modificações moleculares e bioquímicas que conduzem o espermatozoide para a hiperativação, reação acrossômica e, conseqüentemente, fertilização (Gervasi e Visconti, 2017). Vale ressaltar que a capacitação, mas não a maturação espermática, pode ser reproduzida *in vitro* pela incubação dos espermatozoides em meios de cultura apropriados (Kawano e Yoshida, 2007). Sabe-se que proteínas espermáticas e suas interações com outras proteínas, como aquelas oriundas do plasma seminal, podem contribuir

durante os eventos de maturação pós-testicular, tornando-as potenciais alvos para o desenvolvimento de fármacos contraceptivos masculinos.

Dentre as macromoléculas que formam complexos proteicos com impacto na fertilidade masculina, destacamos a proteína espermática EPPIN (*Epididymal protease inhibitor*), devido às suas funções essenciais na motilidade espermática (O'rand et al., 2011). Estudos demonstraram que primatas não-humanos com alta titulação de anticorpos anti-EPPIN, no plasma e sêmen, induzidas por imunização ativa com a EPPIN recombinante humana tiveram sua fertilidade interrompida (O'Rand et al., 2004). A fertilidade desses macacos foi recuperada após a interrupção da imunização sem nenhum efeito adverso óbvio (O'Rand et al., 2004). Esses resultados confirmaram que a perda da função da EPPIN via interação com ligantes inibiu reversivelmente a fertilidade masculina, colocando a EPPIN no topo da lista de alvos para contracepção masculina induzida pela perda da função espermática.

A EPPIN é sintetizada no epitélio seminífero (pelas células de Sertoli e da linhagem espermatogênica) e no epitélio epididimário, sendo encontrada na superfície do espermatozoide e associada a estruturas do (Mariani et al., 2020; Richardson, Richard T et al., 2001; Silva et al., 2021; Silva, Hamil, et al., 2012). Do ponto de vista estrutural, a EPPIN possui sequências consensos de peptídeo sinal (resíduos 1 a 22) e dos domínios inibidores de protease dos tipos WFDC e Kunitz, localizados na região N-terminal (resíduos 22 a 75) e C-terminal (resíduos 76-133), respectivamente. Essa proteína pertence à família dos inibidores de protease com alta conservação, chegando a ~65% de identidade entre a sequência primária da EPPIN humana e murina, o que indica sua importância para a fertilidade durante processos de especiação.

No espermatozoide ejaculado humano, a EPPIN forma um complexo proteico com outras proteínas, como a lactotransferrina (LTF), clusterina (CLU) e semenogelina 1 (SEMG1), com consequências relevantes para a função e viabilidade do espermatozoide durante sua passagem pelo sistema genital feminino (Kawano e Yoshida, 2007; Wang et al., 2005, 2007). De fato, a interação entre a EPPIN e a SEMG1 na superfície do espermatozoide ejaculado é um evento essencial para a fertilidade masculina, pois promove a inibição temporária da motilidade espermática após a ejaculação no coágulo de sêmen, estrutura gelatinosa que protege os espermatozoides logo após sua saída do trato reprodutor masculino (O'Rand et al., 2006). Somente após a clivagem da SEMG1 pela protease antígeno específico da próstata (PSA), ocorre a liquefação do coágulo de sêmen e a ativação da motilidade espermática (Gagnon et al., 1999; O'rand et al., 2011). Estudos demonstraram que anticorpos anti-EPPIN, cujo epítipo tem sobreposição com o sítio de interação da SEMG1, mimetizam o efeito da interação EPPIN-

SEMG1 e inibem a motilidade espermática (O’Rand et al., 2004, 2009; O’rand et al., 2011; O’Rand e Widgren, 2012).

Dados recentes do nosso grupo demonstraram que a EPPIN murina interage com proteínas secretadas pela glândula seminal, como a SVS2 (proteína ortóloga à SEMG1 humana), dando suporte ao uso do camundongo como modelo experimental para estudos envolvendo a EPPIN como alvo para contracepção (Mariani *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2021). Além disso, foi observado que proteínas estruturais do flagelo do espermatozoide, como a GAPDS (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) e AKAP4 (proteína âncora 4 da quinase A), emergem como potenciais parceiras de ligação da EPPIN no espermatozoide murino (Mariani et al., 2019) Nossos resultados ampliaram o leque de possíveis IPPs envolvendo a EPPIN, indicando a extraordinária complexidade funcional dessa proteína e a necessidade de avançar no estudo de sua estrutura e função.

A GADPHS é uma isoforma específica do espermatozoide envolvida na via glicolítica que desempenha papéis essenciais na motilidade espermática (Miki, Qu, Goulding, Eugenia H, *et al.*, 2004). Camundongos knockout para o gene *Gapdhs* são inférteis, em parte, devido a defeitos na motilidade dos espermatozoides (Miki, Qu, Goulding, Eugenia H, *et al.*, 2004). Já a AKAP4 é a proteína mais abundante da bainha fibrosa, estrutura presente no flagelo do espermatozoide de mamíferos (Fang *et al.*, 2019). Camundongos knockout para *Akap4* produzem um número normal de espermatozoides, entretanto, estes não apresentam motilidade progressiva, resultando em fenótipo de infertilidade masculina (Baccetti *et al.*, 2005). Vale destacar que assim como a EPPIN, a GAPDHS e AKAP4 estão no escopo de alvos para contracepção masculina (Hughes *et al.*, 2009; Miki, Qu, Goulding, Eugenia H., *et al.*, 2004; O’rand *et al.*, 2011). Sendo assim, a identificação da GAPDHS e AKAP4 como potenciais proteínas parceiras da EPPIN fornece novas interpretações e perspectivas para o potencial dessas interações na fertilidade masculina, e de como elas podem ser exploradas visando o desenvolvimento de drogas contraceptivas.

A capacidade da EPPIN interagir com moléculas orgânicas pequenas foi confirmada pela demonstração de que compostos experimentais podem se ligar e modular suas funções. Esses estudos resultaram no desenvolvimento de três compostos orgânicos pequenos derivados de um esqueleto base contendo o anel 1, 3, 5-triazínico, denominados: EP055 e EP054 (O’Rand *et al.*, 2018). A exposição do espermatozoide humano e de primatas não humanos a esses compostos resultou em inibição significativa da motilidade espermática, revelando seu potencial contraceptivo (O’Rand *et al.*, 2018). O EP055 apresentou o mesmo efeito quando administrado por via endovenosa em macacos, o que o tornou um protótipo de uma classe de compostos

radicalmente inovadores para contracepção masculina (O’Rand *et al.*, 2018). Estudos computacionais utilizando modelos da EPPIN por homologia indicaram resíduos em comum na interface de interação da EPPIN com o composto EP055 e com a SEMG1, respectivamente (O’Rand, Silva e Hamil, 2016; Shan *et al.*, 2019; Silva, Hamil, *et al.*, 2012). Entretanto, os aspectos moleculares e estruturais da interação entre a EPPIN com seus ligantes exógenos ainda permanece obscuro. Pesquisas nessa área são relevantes para ampliar as possibilidades de desenho racional de ligantes da EPPIN com aplicações terapêuticas como contraceptivos masculinos.

Recentemente, avanços na área da modelagem molecular permitiram que pesquisadores pudessem prever a estrutura tridimensional de proteínas a partir da sua sequência primária de aminoácidos, utilizando ferramentas de inteligência artificial como o AlphaFold (Jumper *et al.*, 2021). e RoseTTAFold (Baek *et al.*, 2021). Isso garante que a predição final de uma determinada proteína não tem viés de um modelo estrutural, mas de um padrão de disposição dos aminoácidos no espaço obtido a partir de uma grande quantidade de dados experimentais. Essas predições, portanto, possuem a maior confiança já demonstrada na literatura quando comparada com modelos experimentais (Jumper *et al.*, 2021). Assim, estudos estruturais do modelo predito da EPPIN podem identificar regiões importantes para a interação com seus parceiros, bem como para interação com pequenas moléculas. Esse conhecimento pode servir como base para o desenvolvimento de estratégias que conduzam a modulação da EPPIN.

Neste trabalho realizamos investigações sob duas perspectivas complementares em busca de um contraceptivo masculino não-hormonal. Na primeira, avaliamos a distribuição e colocalização das potenciais parceiras de interação da EPPIN no espermatozoide de camundongos durante seu percurso do epidídimo até o sistema genital feminino como alvos contraceptivos, evidenciando uma estabilidade e distribuição dessas proteínas no espermatozoide murino, bem como a colocalização desses alvos localizadas essencialmente na peça intermediária e principal do flagelo. Na segunda perspectiva desse estudo, exploramos diferentes conformações da EPPIN e suas principais interações moleculares com um ligante exógeno, a partir de um modelo estrutural da EPPIN predito pela plataforma AlphaFold. Neste aspecto, demonstramos uma baixa variação dos ângulos entre os domínios WFDC e Kunitz, mas que nos permitiu categorizar conformações da EPPIN em abertas, intermediárias e fechadas. As conformações intermediárias foram as que apresentaram melhor acomodação do ligante no sítio de ligação da EPPIN, ressaltando a participação dos domínios WFDC e Kunitz na interface de contatos desses complexos ligante-receptor. Esses resultados têm o potencial de fornecer novos conhecimentos à área experimental a respeito das potenciais interações da

EPPIN com outras proteínas espermáticas, assim como à área computacional pela aquisição de detalhes da estrutura da EPPIN e de possíveis ligantes, vislumbrando avançar no entendimento funcional e estrutural dessas proteínas e de suas interações como estratégias farmacológicas passíveis de manipulação para o desenvolvimento de um contraceptivo masculino não-hormonal.

Objetivos

Investigar aspectos funcionais e estruturais da EPPIN, com ênfase nas suas proteínas de interação e potenciais sítios passíveis de intervenção farmacológica com aplicações na contracepção masculina.

Objetivos específicos

- 1) Investigar o perfil de distribuição e colocalização da EPPIN e de suas proteínas parceiras.
- 2) Explorar a estrutura da EPPIN e identificar um sítio de reconhecimento com o composto experimental EP055.

2. METODOLOGIA

2.1 Delineamento experimental

O delineamento experimental do projeto foi dividido em duas partes principais:

2.1.1 Primeira parte

Investigar o perfil de distribuição e colocalização da EPPIN e de suas proteínas parceiras:

A) Isolamento dos espermatozoides maduros da cauda do epidídimo seguido ou não da indução da capacitação *in vitro*; **B)** Indução do estro nas fêmeas, acasalamento e isolamento dos espermatozoides das diferentes regiões do trato reprodutor feminino (vagina; útero proximal; útero distal e junção útero-tubal/oviduto). Em seguida, após a obtenção de espermatozoides pelas etapas A e B, as amostras seguiram para ensaios de imunofluorescência para verificar a localização celular da EPPIN e de suas potenciais proteínas de interação AKAP4 e GAPDHS em espermatozoides maduros coletados do epidídimo, capacitados *in vitro* ou recém ejaculados no trato reprodutor feminino (Figura 1).

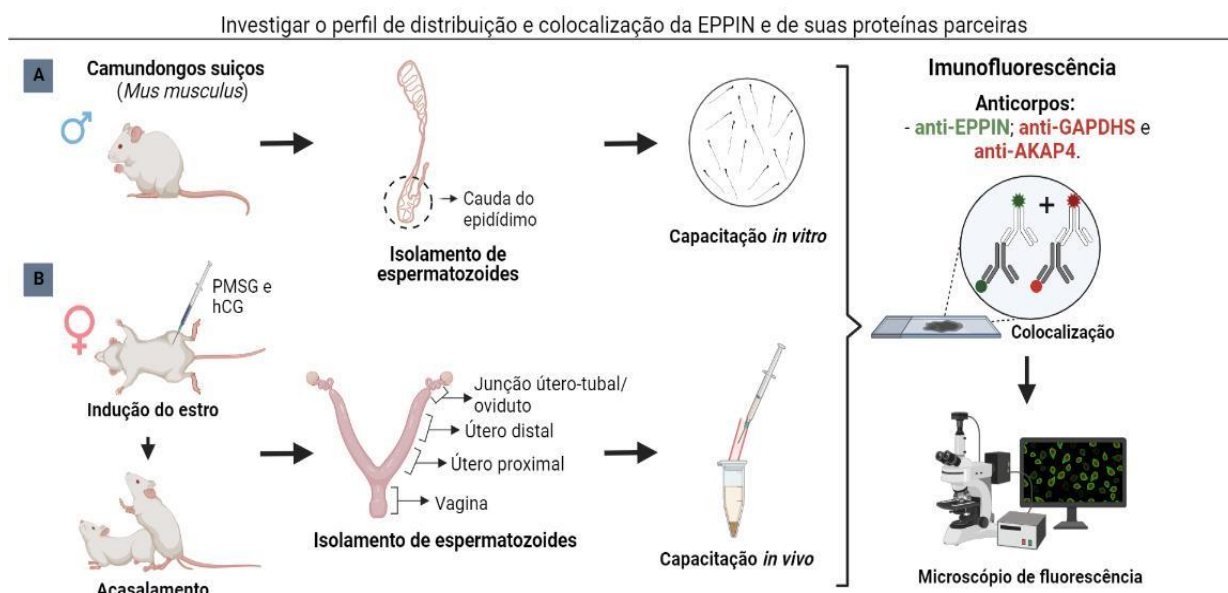


Figura 1. Representação esquemática da primeira parte do delineamento experimental do projeto. Elaborada pela plataforma BioRender.com.

2.1.2 Segunda parte

Explorar a estrutura da EPPIN e sua interação com o ligante EP055: **A)** Dinâmica molecular da EPPIN sob a perspectiva da técnica de Dinâmica Molecular por Modos Normais Excitados (DM-MNE); **B)** Atracamento de Docking Molecular com o ligante EP55 (Figura 2).

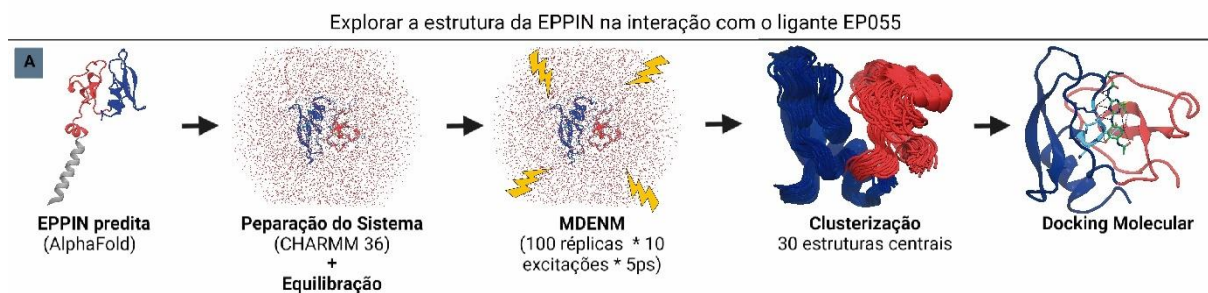


Figura 2. Representação esquemática da segunda parte do delineamento experimental do projeto. Elaborada pela plataforma BioRender.com.

2.2 Metodologias para a primeira parte do estudo

2.2.1 Animais

Utilizamos camundongos (*Mus musculus*) suíços, machos e fêmeas adultos (90-120 dias) provenientes do Centro de Pesquisa e Produção de Animais (CPPA), Instituto de Biotecnologia (IBTEC), UNESP-Botucatu. Os camundongos ficaram alojados no Biotério do Departamento de Biofísica e Farmacologia do IBB/UNESP em ambiente controlado (temperatura 23-25°C, ciclo 12 h claro/escuro), com água e dieta *ad libitum*, por pelo menos uma semana antes do uso. Os animais foram eutanasiados por *overdose* de isoflurano (4%, via inalatória) seguido de deslocamento cervical. Os procedimentos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética para o Uso de Animais (CEUA), IBB/UNESP (protocolo número: 5402261121).

2.2.2 Coleta de espermatozoides maduros da cauda do epidídimo e capacitação *in vitro*

Após a eutanásia dos camundongos, suas caudas dos epidídimos contendo os espermatozoides maduros foram dissecadas e transferidas para placa de Petri contendo meio de cultura TYH (NaCl 100 mM, KCl 4,7 mM, KH₂PO₄ 1,2 mM, MgSO₄ 1,2 mM, glicose 5,5 mM, ácido pirúvico 0,8 mM, CaCl₂ 1,7 mM e HEPES 20 mM, pH 7,2-7,4). Em seguida, os tecidos foram cortados com tesoura para liberação dos espermatozoides no meio, e incubados a 37 °C por 10 min (5% CO₂/95% ar). Em seguida, removemos os tecidos do meio, e realizamos a contagem espermática em câmara de Neubauer para ajustes de concentração espermática. Para indução da capacitação *in vitro*, o meio de cultura TYH contendo os espermatozoides foi suplementado com albumina do soro bovino (BSA, 0,75% m/v) e bicarbonato de sódio (NaH₂CO₃, 20 mM), e posteriormente os espermatozoides foram incubados à 37°C por 60 min (5% CO₂/95% ar) para indução da capacitação *in vitro*.

2.2.3 Acasalamento e coleta dos espermatozoides ejaculados

Para coleta dos espermatozoides após a cópula seguimos a metodologia descrita por (Kawano e Yoshida, 2007). Resumidamente, o estro foi induzido nas fêmeas pela injeção de gonadotrofina do soro de égua gestante (PMSG) (5 UI, i.p.), seguida pela gonadotrofina coriônica humana (hCG) (5 UI, i.p.) 48 h após a PMSG. Doze horas após a injeção de hCG, as fêmeas foram engaioladas com os camundongos machos sob observação. Imediatamente após o acasalamento, a existência do plugue copulatório foi verificado para confirmação do sucesso da cópula. Os espermatozoides foram coletados após a cópula em diferentes tempos (0, 1, 2 e 3 horas) a fim de encontrá-los em diferentes regiões do trato reprodutor feminino (vagina, útero proximal, útero distal e junção útero-tubal/oviduto). Após a coleta, os espermatozoides de cada segmento foram lavados em tampão PBS pH 7,4, centrifugado ($2.000 \times g$ por 15 minutos) e o precipitado contendo os espermatozoides foi coletado para posteriores ensaios de Imunofluorescência.

2.2.4 Ensaios de imunofluorescência

Após a coleta dos espermatozoides conforme descrito nos itens 3.3 e 3.4, os espermatozoides foram suspensos para $4,0 - 6,0 \times 10^6$ células/ml em tampão PBS pH 7,4. Em seguida, realizamos esfregaços das suspensões de espermatozoides em lâminas silanizadas. Os esfregaços foram fixados em solução de paraformaldeído 4% diluído em tampão PBS e posteriormente incubados com solução de bloqueio (tampão fosfato contendo BSA 1%, m/v) na presença de saponina 0,02%. Posteriormente, as lâminas foram incubadas com pelo menos dois dos seguintes anticorpos primários: i) anti-EPPIN Q20E (40 µg/mL – Catálogo: IM0773 – Rheabiotech) (Mariani *et al.*, 2020); ii) anti-GAPDHS (6 µg/mL – Catálogo: ab153802 - Abcam); e iii) anti-AKAP4 (10 µg/mL – Catálogo: E-AB-65117 – Elabscience) durante a noite à 4°C. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpos secundários específicos anti-cabra Alexa Fluor 488 (10 µg/ml) e anti-coelho Alexa Fluor 594 (10 µg/ml) por 1h TA. Após a incubação com os respectivos anticorpos secundários, incubamos as lâminas com solução de 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para marcação dos núcleos celulares por 1h TA. Ensaios de controle negativo foram realizados na ausência de um ou de ambos os anticorpos primários.

2.3 Metodologias da segunda parte do estudo

2.3.1 Modelo da EPPIN e estrutura do EP055

O modelo tridimensional da EPPIN humana foi obtida do banco de dados do AlphaFoldBD (Disponível em: <https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/O95925> (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*,

2022), e a sequência primária total de aminoácidos (133 resíduos) utilizada para o modelo predito foi referente ao código de identificação Uniprot - O95925. A predição de um modelo pelo AlphaFold fornece uma pontuação de confiança por resíduo (pLDDT) entre 0 e 100. Sendo que a confiança do modelo pode se apresentar como muito alta (pLDDT > 90); alta (90 > pLDDT > 70); baixa (70 > pLDDT > 50) e muito baixa (pLDDT < 50). Para as análises, o peptídeo sinal (1 – 22 resíduos) foi removido, mantendo somente os domínios N- e C-terminal. A estrutura do EP055 (O’Rand *et al.*, 2018) foi construída a partir do *servidor Automated Topology Builder and Repository* (<https://atb.uq.edu.au/login.py>) (Malde *et al.*, 2011).

2.3.2 Montagem do sistema de simulação de dinâmica molecular

O modelo inicial da EPPIN foi submetido à montagem de um sistema controlado no Gromacs 2020.3, sob um campo de força CHARMM36m (Huang *et al.*, 2016) Nenhum resíduo protonado foi identificado pelo servidor PROPKA3 (Olsson *et al.*, 2011). EPPIN foi colocada em uma caixa octaédrica de 12 Å de distância do átomo na posição mais extrema do modelo na direção XYZ. O sistema foi solvatado com modelos de água do tipo TIP3P e adicionado 0,15 M de NaCl (17,751 de TIP3P, 170 de Na⁺ e 47 de Cl⁻), adicionando íons com o intuito de se obter a carga do sistema igual a 0. Essas etapas foram realizadas no servidor CHARMM-GUI (Brooks *et al.*, 2009; Jo *et al.*, 2008). Uma vez montado, o sistema foi minimizado por meio de um gradiente de energia abaixo de 100 kJ/mol/nm². Na equilibração, nós modificamos o protocolo do CHARMM-GUI adicionando mais três etapas de equilibração para garantir uma suavização das forças do sistema. Na primeira etapa, um conjunto canônico de número igual de átomos, volume e temperatura foi aplicado (NVT), controlado pelo termostato V-rescale (Bussi, Donadio e Parrinello, 2007) a 300 K durante 1 ns. Nas etapas seguintes, um conjunto isotérmico-isobárico (NPT) foi aplicado, monitorando a pressão a 1bar por 1ns com o barostato Berendsen (Eslami, Mojahedi e Moghadasi, 2010). Na terceira e quarta etapa utilizamos o termostato Nosé-Hoover (Hoover, 1985; Nosé, 2006) e barostato Parrinello-Rahman (Humphrey, Dalke e Schulten, 1996) por 5ns e 1ns respectivamente. Em todas essas etapas, utilizou-se um tempo de integração de 2 femtosegundos e os átomos da cadeia principal e lateral foram restringidos harmonicamente a uma força de 400 e 40 kJ.mol⁻¹.nm⁻², respectivamente. Adicionalmente, na quarta etapa, tais forças foram reduzidas em 90%. As interações não ligadas (*non-bonded*) foram aplicadas em distância de 12 Å, com uma função de força de (*switch function*) entre 10 e 12 Å.

2.3.3 Cálculo dos modos normais (MN) e dinâmica molecular por modos normais excitados (DM-MNE)

Os MNs da EPPIN foram calculados a partir da estrutura da EPPIN devidamente equilibrada utilizando a ferramenta Bio3D, onde foram selecionado aqueles com alta amplitude de movimento e que expusessem a sequência de Asparagina, chamada como seq. Asn113-Asn116, ao solvente (Grant *et al.*, 2006; Skjaerven *et al.*, 2014). Esses modos foram combinados linearmente (cada modo foi multiplicado por um fator entre -1 e 1) para obter 100 MNs, de maneira a aumentar a exploração conformacional da EPPIN. Esses MNs foram empregados como direções de excitação da EPPIN usando DM-MME. Essa técnica consiste em etapas de excitação do sistema (dos átomos selecionados, no nosso caso a EPPIN) ao longo dos vetores de MNs, por meio de pequenos *inputs* de energia cinética. Assim, o sistema excitado é deformado na direção de tais vetores em curtas etapas de DM, dentro do contexto de um sistema em solvente explícito (Costa *et al.*, 2015). Cada simulação ao longo de um MN combinado corresponde a uma réplica, que foram submetidas a 10 excitações de 5 ps, totalizando 5000 conformações da estrutura da EPPIN (100 réplicas x 10 excitações x 5 ps), com um *input* de energia cinética de 3 K. Em seguida, as 5000 conformações foram clusterizadas de acordo com o RMSD (raiz quadrada do desvio quadrático médio) dos átomos da cadeia principal, usando ponto um de corte abaixo de 1 Å, resultando em 30 clusters. Esta etapa foi realizada usando a ferramenta do GROMACS chamada *gmx cluster*.

2.3.4 Atracamento Molecular

A fim de encontrar regiões de interação energeticamente favoráveis envolvendo a EPPIN e o ligante EP055, foi realizada uma etapa de Atracamento Molecular utilizando o AutoDock4 (Morris *et al.*, 2009). Para as estruturas centrais de cada um dos 30 clusters obtidos por MD-MNE foi estabelecida uma caixa de busca capaz de revestir todos os resíduos da EPPIN. Os ensaios de atracamento molecular foram feitos em triplicata, com mil poses cada réplica, agrupando-as de acordo com um ponto de corte de RMSD abaixo de 2 Å. 300 complexos da EPPIN com o EP055 foram encontrados, os quais foram analisados e filtrados com base na menor energia livre de ligação (ΔG) e maior número de repetição do ligante na mesma posição (nRP). Em seguida, medidas como a distância entre o centro de massa do ligante e da seq. Asn113-Asn116, e os tipos de interações hidrofóbicas e polares estabelecidas em uma distância menor de 4.5 Å e 3,5 Å, respectivamente, entre a EPPIN e o EP055.

2.4 Análise dos resultados

Analizamos os resultados em microscópio de epifluorescência, disponíveis na UNIPEX - Unidade de Pesquisa Experimental da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB/UNESP). Cada alvo (EPPIN, AKAP4 e GAPDHS) foi observado por fluoróforos de colorações diferentes para que posteriormente as imagens fossem sobrepostas em software de processamento de imagem a fim de obter as suas respectivas localizações celulares no espermatozoide, e em seguida estabelecer a região do espermatozoide em que essas proteínas estão colocalizadas.

Os resultados da modelagem molecular e Atracamento Molecular foram analisados na tentativa de: i) determinar as conformações da EPPIN que permitam melhor interação com o EP055 e ii) identificar regiões importantes da interface do complexo EPPIN/EP055 a partir de sua análise conformacional, evidenciando os principais resíduos da interação ligante-receptor.

3. RESULTADOS

3.1 Distribuição e colocalização das proteínas espermáticas EPPIN, GAPDHS e AKAP4 no espermatozoide coletado da cauda do epidídimo capacitado ou não *in vitro*

A fim de identificar a distribuição celular das proteínas alvos deste trabalho, realizamos ensaios de imunofluorescência em espermatozoides maduros submetidos ou não à capacitação *in vitro*. Para essas duas condições experimentais foi encontrado um perfil similar de distribuição e de colocalização das proteínas espermáticas EPPIN, GAPDHS e AKAP4 (Figura 3).

A EPPIN apresentou imunomarcção positiva em regiões da cabeça e no flagelo, tanto na peça intermediária (maior intensidade), como na peça principal (menor intensidade) e peça final (apenas em espermatozoides capacitados *in vitro*) (Figura 3A-D). A imunomarcção da GAPDHS foi observada somente na peça principal, com variação de intensidade, sendo em geral imunomarcada mais intensamente na região proximal da peça principal (próxima ao ânulo) e menos intensamente na região distal da peça principal. A AKAP4 esteve presente eventualmente na cabeça (acrossoma anterior ou segmento equatorial) e constantemente no flagelo (peça intermediária e principal), com imunomarcção mais acentuada na peça principal.

Com base no padrão de imunomarcção das proteínas, a colocalização da EPPIN com a GAPDHS e AKAP4 foi observada somente na peça principal, e nas peças intermediária e principal do flagelo, respectivamente (Figura 3A e C e 3B e D, respectivamente). Em ambos os casos, a colocalização da EPPIN com a GAPDHS e AKAP4 na peça principal do flagelo foi mais evidente em sua região proximal (próxima ao ânulo). Embora ambas, EPPIN e AKAP4, tenham sido observadas em regiões da cabeça, não foi possível identificar a colocalização dessas proteínas nessa região. O perfil de distribuição e a colocalização da EPPIN com GAPHS ou AKAP4 foi semelhante em espermatozoides maduros isolados da cauda do epidídimo, mantidos em meio não capacitante (Figura 3A-B); e espermatozoides maduros isolados da cauda do epidídimo capacitados *in vitro* após incubação em meio capacitante (Figura 3C-D). Além disso, como estratégia para obtenção de controles negativos, na ausência de pelo menos um dos anticorpos primários para os alvos EPPIN, GAPDHS e AKAP4 não foram encontradas nenhuma marcação (Figura suplementar S1, disponível em ANEXO I).

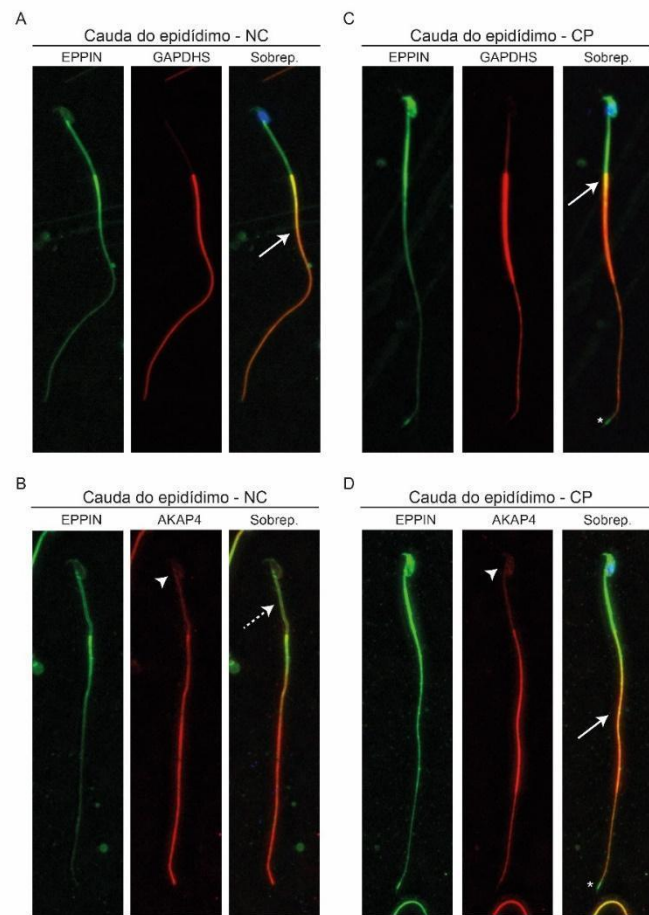


Figura 3. Perfil de distribuição e colocalização da EPPIN e GAPDHS (A e C) ou EPPIN e AKAP4 (B e D) em espermatozoides maduros ou capacitados *in vitro*. Imunomarcagem da EPPIN (verde) e GAPDHS ou AKAP4 (vermelho) em espermatozoides coletados da cauda do epidídimo em meio não capacitante (painéis à esquerda) ou em meio capacitante (painéis à direita), representando espermatozoides maduros e capacitados, respectivamente. Colocalização da EPPIN e GAPDHS ou AKAP4 na peça principal (seta) e entre EPPIN e AKAP4 na peça intermediária (seta pontilhada). Presença da AKAP4 no segmento equatorial (ponta de seta) da cabeça do espermatozoide. Presença da EPPIN presente na peça final do flagelo (*). Sobreposição com DAPI (azul). NC espermatozoides não capacitados. CP: espermatozoides capacitados. Sobrep.: Sobreposição. Resultados representativos de três experimentos independentes. Barra de escala: 50 μ m.

3.2 Distribuição e colocalização das proteínas EPPIN, GAPDHS e AKAP4 no espermatozoide ejaculado coletado de diferentes porções do trato reprodutor feminino

A distribuição das proteínas EPPIN, GAPDHS e AKAP4 na estrutura do espermatozoide ejaculado foi avaliada em quatro diferentes porções do trato reprodutor feminino: vagina, útero proximal (porção do útero próxima à cérvix), útero distal (porção do útero próxima ao oviduto) e junção útero-tubal/oviduto) a fim de verificar a localização celular dessas proteínas em diferentes estágios da capacitação espermática durante o percurso do espermatozoide até o seu local de fertilização (Figura 4). Verificamos que o perfil de distribuição da EPPIN, GAPDHS e AKAP4 no espermatozoide ejaculado foi semelhante entre as diferentes porções do trato

reprodutor feminino, assim como não apresentou alterações em relação ao perfil observado nos espermatozoides isolados da cauda do epidídimo e capacitados *in vitro* (Figuras 3 e 4). Portanto, a colocalização da EPPIN com a GAPDHS foi observada apenas na peça principal do flagelo (Figura 4A-D) e a colocalização da EPPIN com a AKAP4 foi observada tanto na peça intermediária como principal do flagelo (Figura 4E-H), independentemente do grau de capacitação dos espermatozoides.

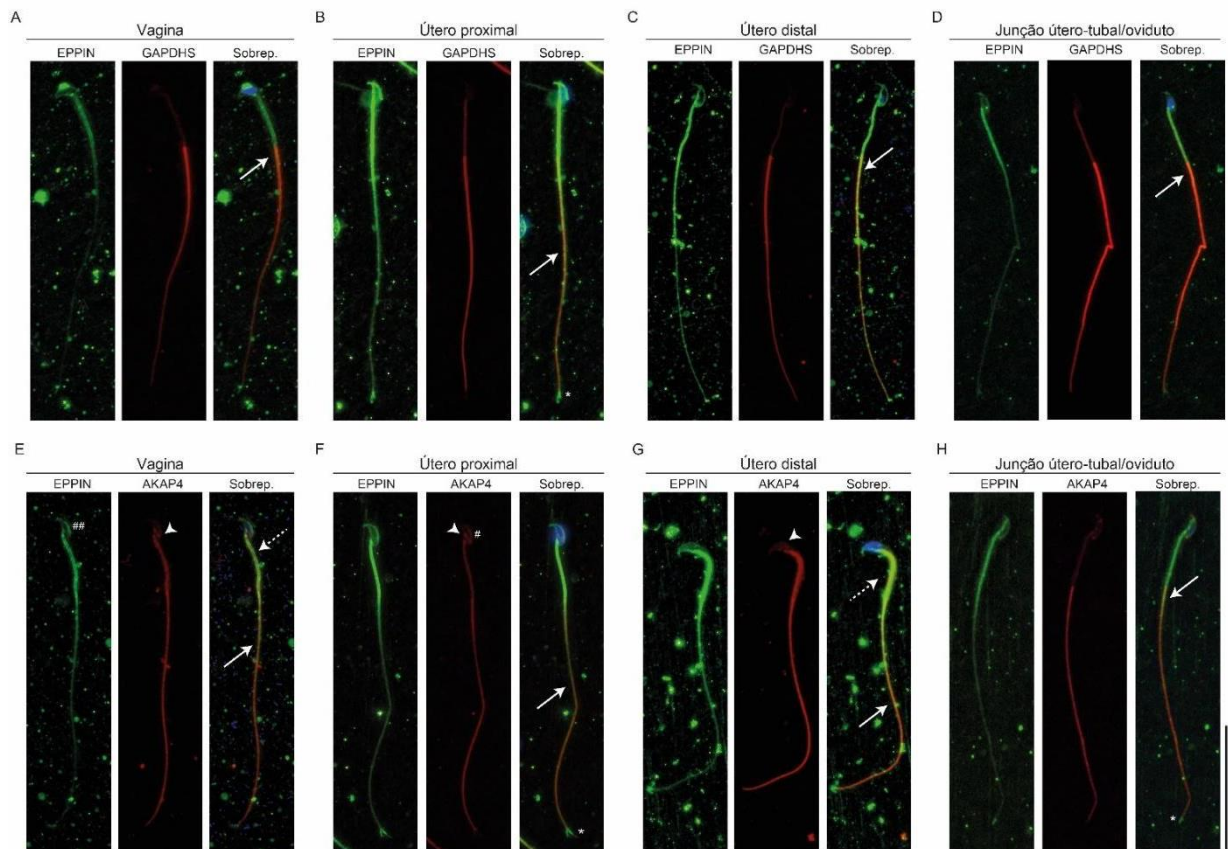


Figura 4. Perfil de distribuição e colocalização da EPPIN e GAPDHS (A-D – painéis superiores) ou EPPIN e AKAP4 (E-H – painéis inferiores) em espermatozoides capacitados de diferentes porções do trato reprodutor feminino. Imunomarcagem da EPPIN (verde) e GAPDHS ou AKAP4 (vermelho) em espermatozoides coletados da vagina (A, E), útero proximal (B, F), útero distal (C, G) e junção útero-tubal/oviduto (D, H) durante o processo de capacitação *in vivo*. Colocalização da EPPIN e GAPDHS ou AKAP4 na peça principal (seta) e entre EPPIN e AKAP4 na peça intermediária (seta pontilhada). Presença da AKAP4 no acrossoma anterior (#) e no segmento equatorial da cabeça do espermatozoide (ponta de seta). EPPIN presente no acrossoma anterior(##) da cabeça e na peça final do flagelo (*). Sobreposição com DAPI (azul). Sobrep.: Sobreposição. Resultados representativos de três experimentos independentes. Barra de escala: 50 μ m.

3.3 Descrição da sequência e estrutura predita da EPPIN humana pela plataforma AlphaFold

A sequência primária da EPPIN humana composta por 133 resíduos de aminoácidos foi obtida a partir do Uniprot - O95925. O modelo obtido pelo servidor AlphaFold apresentou um

peptídeo sinal (Met1 – Gly21), um clássico domínio WFDC localizado na região N-terminal (Pro22 – Asp75) e um domínio do tipo Kunitz (Val76 – Pro133) localizado na região C-terminal. O peptídeo sinal foi removido para as nossas análises (Figura 5A e B).

A modelagem do AlphaFold apresentou índice pLDDT acima de 90% para a maior parte dos dois domínios, WFDC e Kunitz, e entre 50 e 90% para o peptídeo sinal (Figura 5B). De acordo com a matriz de erro predito, a qual demonstra o erro esperado da posição de cada resíduo, a região do peptídeo sinal apresenta maior erro, mostrando a baixa confiança para tal região (Figura 5C). Os domínios WFDC e Kunitz são constituídos por duas folhas-beta e duas hélice-alfa cada. Tais estruturas secundárias são conectadas por regiões desordenadas. Ainda, o modelo da EPPIN apresentou sete ligações dissulfeto, sendo quatro localizadas no domínio WFDC (Cys33-Cys61, Cys40-Cys65, Cys48-Cys60 e Cys54-Cys69) e 3 no domínio Kunitz (Cys77-Cys127, Cys86-Cys110 e Cys102-Cys123). A estrutura inicial da EPPIN se apresentou como uma conformação fechada, com a sequência de resíduos de asparagina (Asn113-Asn116) pouco exposta ao solvente (Figura 5D).

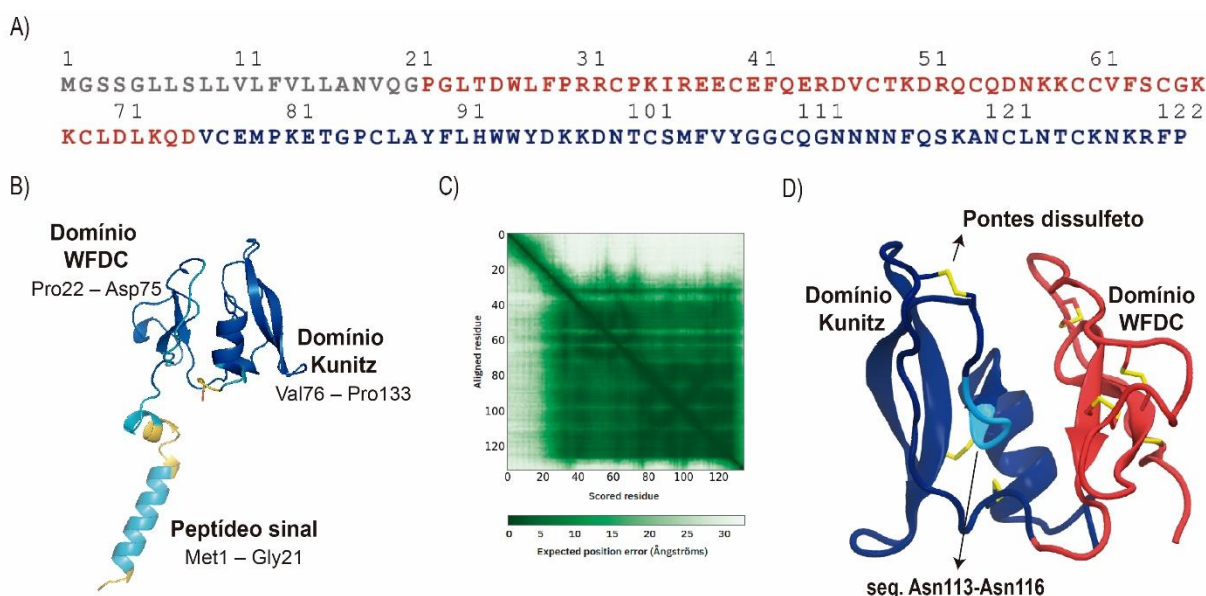


Figura 5. Sequência e estrutura predita da EPPIN humana. (A) sequência primária da EPPIN (Uniprot - O95925), evidenciando peptídeo sinal em cinza (resíduo 1 - 21), domínio WFDC em vermelho (resíduo 22 - 75) e domínio Kunitz em azul escuro (resíduo 76 - 133). (B) Modelo estrutural da EPPIN predito pelo AlphaFold com índice pLDDT, acima de 90% demonstrado em azul escuro, entre 50 e 90% em ciano e abaixo de 50% em amarelo. (C) Matriz de erro esperado da posição de cada resíduo, demonstrado em um gradiente de cor verde, quanto mais claro maior o erro esperado. (D) Conformação inicial da EPPIN, apontando no domínio WFDC em vermelho, quatro pontes dissulfeto e no domínio Kunitz em azul escuro, três pontes dissulfeto e a seq. Asn113-Asn116 em amarelo e ciano, respectivamente.

3.4 Abertura da EPPIN e exposição da sequência de asparagina por DM-NME

Aplicamos o modelo da EPPIN gerado pelo AlphaFold a um sistema de dinâmica molecular. Após equilíbrio, foram gerados diferentes modos excitados, com o propósito de abrir

controladamente regiões entre domínios da EPPIN, assim como expor a seq. Asn113-Asn116, localizada na região C-terminal, a qual foi apresentada por métodos experimentais e computacionais como uma importante região na interação com ligantes (O'rand 2018, shan et al., 2019). A abertura da EPPIN foi modulada pela definição de três pontos estruturais que representam angulações entre os domínios, considerando o centro de massa dos carbonos alfa dos seguintes resíduos: i. resíduos Cys60-Val62 e Lys67-Cys69; ii. resíduos Lys120-Asn129; e iii. resíduos Phe90-Asp96 e Asn100-Tyr107 (Figura 6). Observamos para os 30 clusters selecionados, maiores (Cl. 27 – ângulo $63,18^\circ$) ou menores (Cl. 30 – ângulo $92,17^\circ$) aberturas entre domínios. Além disso, a pose inicial da EPPIN (Cl. 1 – ângulo $71,89^\circ$) foi classificada como uma conformação entre intermediária (Cl. 2, 6, 14, 19 e 24 – ângulo $75\text{--}76^\circ$) e fechada (Figura 7A e C). Embora as aberturas entre domínios dos 30 clusters não apresentaram muita variação ($\sim 29^\circ$), as conformações fechadas apresentaram bolsões pequenos, enquanto que as conformações abertas apresentaram bolsões extensos e com pouca delimitação pela superfície (Figura 7B e D; Tabela 2).

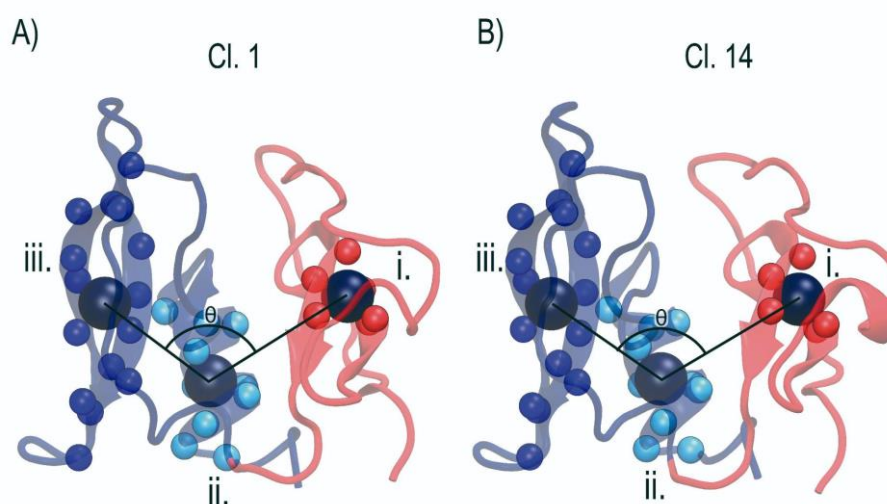


Figura 6. Abertura estrutural dos clusters representada por suas respectivas angulações. (A) Abertura do cluster de maior número de repetição do ligante na mesma posição (Cl. 1) com ângulo θ de $76,39^\circ$. (B) Abertura do cluster de menor energia de ligação (Cl. 14) com ângulo θ de $71,89$. Para (A) e (B) os pontos estruturais representam marcações de: 6 resíduos para i. (Cys60-Val62 e Lys67-Cys69), 10 resíduos para ii. (Lys120-Asn129) e 15 resíduos para iii. (Phe90-Asp96 e Asn100-Tyr107).

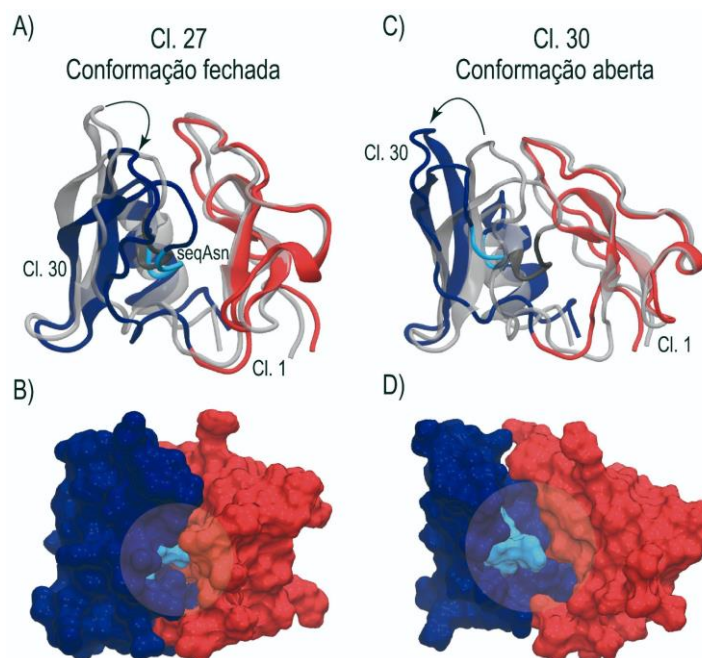


Figura 7. Conformação mais fechada e aberta da EPPIN. (A) e (B) indica Cl. 27 (mais fechado) sobreposto com o Cl. 1 como referência (cinza), demonstrado em cartoon e superfície respectivamente. (C) e (D) indica Cl. 30 (mais aberto) sobreposto com o Cl. 1 como referência (cinza), demonstrado em cartoon e superfície respectivamente. (A - D) apresenta o domínio WFDC (azul), Kunitz (vermelho) e seq. Asn113-Asn116 (ciano).

3.5 Interações do complexo EPPIN/EP055 por Docking Molecular

As 30 estruturas centrais dos clusters da EPPIN foram adicionadas em uma caixa de busca para a ancoragem do EP055. A fim de identificar a proximidade do EP055 à seq. Asn113-Asn116, estabelecemos uma medida em Å, entre o centro de massa do EP055 (CM-EP) e da seq. Asn113-Asn116 (CM-ASN). Após a análise das três réplicas de cada complexo e a reprodutibilidade de posição do ligante entre elas, os clusters que apresentaram conformações mais fechadas (Cl. 3, 9, 10, 16, 23 e 27) ou mais abertas (Cl. 13, 17, 21, 30) dificultaram a interação do EP055 com seq. Asn113-Asn116 (sítio de interação da EPPIN). Isso pôde ser observado pela inconsistência entre as réplicas de cada cluster. Em contrapartida, os complexos que apresentaram uma menor distância entre CM-EP/ASN foram os com aberturas intermediárias da estrutura da EPPIN (Cl. 2, 6, 14, 19 e 24). (Tabela 2).

Como estratégia para uma análise detalhada da interação da EPPIN com o EP055, selecionamos os resultados de Atracamento Molecular de acordo com o complexo de menor energia livre de ligação (ΔG) ou de maior número de repetição do ligante na mesma posição (nRP). O Cl. 14/Rep. 3 foi o complexo de menor valor de energia livre (-8,46 kcal/mol), enquanto o Cl. 1/Rep. 2 apresentou uma maior nRP (20) (Figura 8).

Interessantemente, a conformação do Cl. 14 e 1 apresentam semelhanças na superfície do sítio de interação, demonstrado pelas angulações de 76,39 e 71,89°, respectivamente (Figura 6). Por outro lado, os valores de ΔG para a interação com o EP055 foram levemente mais favorável no Cl.14 (ΔG médio = $-7.90 \pm 0,63$ kcal/mol) que no Cl1. (ΔG médio = $-7.57 \pm 0,30$ kcal/mol), ao passo que o nRP foi menor, 12 e 20, respectivamente. (Tabela 1)

Outro aspecto importante a ser considerado, avaliando as poses de menor ΔG , é que a disposição do EP055 no Cl. 14 apresentou orientação muito próxima entre as réplicas, com valores de RMSD de 3,67 e 1,26 Å para rep2 e rep3 usando rep1 como referência. Já CL. 1, apesar do seu ΔG ser próximo às demais réplicas (rep2 como referência, RMSD de 4,29 Å para rep3), apresentou uma réplica (rep1) distante da seq. Asn113-Asn116 (rep1 como referência, RMSD de 20,71 e 19,90 Å para rep2 e 3 respectivamente). Tabela 2 (valores das distâncias de centro de massa) e (Figura 8A e B).

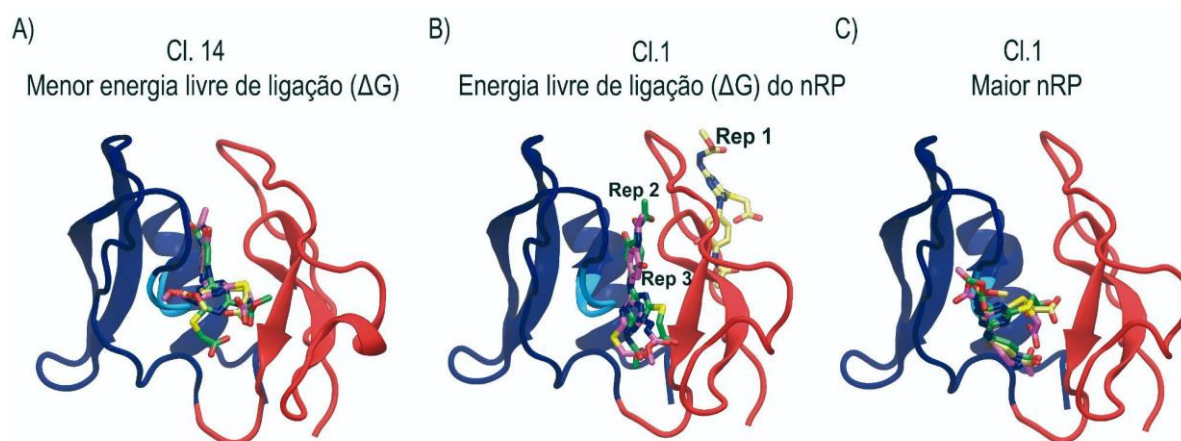


Figura 8. Réplicas do atracamento molecular entre a EPPIN e o EP055. (A) Cl. 14 (de menor energia livre de ligação) obteve, utilizando a Rep. 1 (amarelo) como referência, os valores de RMSD de Rep. 2 (verde) e 3 (rosa) foram 3,67 e 1,26 Å, respectivamente. (B) Cl. 1 (energia livre de ligação do nRP) obteve, utilizando a Rep. 1 (amarelo) como referência, os valores de RMSD para Rep. 2 (verde) e 3 (rosa) de 20,71 e 19,90 Å, respectivamente. (C) Cl. 1 (nRP) obteve, utilizando a Rep. 1 (amarelo) como referência, os valores de RMSD para Rep. 2 (verde) e 3 (rosa) de 1,27 e 1,68 Å, respectivamente.

Finalmente, analisamos os resíduos da EPPIN em contato com o EP055, destacando os tipos de interações moleculares para cada complexo selecionado, Cl. 14/Rep. 3 e Cl. 1/Rep2. Para analisá-los, definimos ligações polares de até 3,5 Å e ligações hidrofóbicas de até 4,5 Å.

O Cl. 14 apresentou 11 ligações polares e 4 ligações hidrofóbicas entre os domínios WFDC e Kunitz, incluindo a seq. Asn113-Asn116. Em relação às interações polares, o domínio WFDC apresentou contatos entre as cadeias laterais dos resíduos: i. Glu44 e o grupamento fenol do anel aromático; ii. Lys58 e o ácido carboxílico ligado ao enxofre (Figura 9A). Já no domínio Kunitz, estabeleceu-se ligações das cadeias laterais dos resíduos: i. Tyr107 com o grupamento

fenol do anel aromático; ii. Asn114 com o anel triazínico e o nitrogênio que conecta o anel aromático com o anel triazínico; iii. Gln111 com o grupamento éster e com o grupamento ácido carboxílico ligado ao enxofre. Além de apresentar interação da cadeia principal do resíduo Gly112 da EPPIN com o anel triazínico e os nitrogênios que conectam o R2 (Figura 9B, Figura S2). As ligações hidrofóbicas estabelecidas entre resíduos do domínio WFDC e o EP055 foram com as cadeias laterais dos resíduos: i. Phe42 com o grupamento acetil do anel aromático; ii. Lys58 com o fenol do anel aromático; iii. Cys69 com o carbono entre o grupo carboxílico e o enxofre. Já no domínio Kunitz estabeleceu-se apenas uma interação, entre a cadeia lateral do resíduo Tyr107 e o carbono do anel aromático. (Figura 9C - Tabela 3).

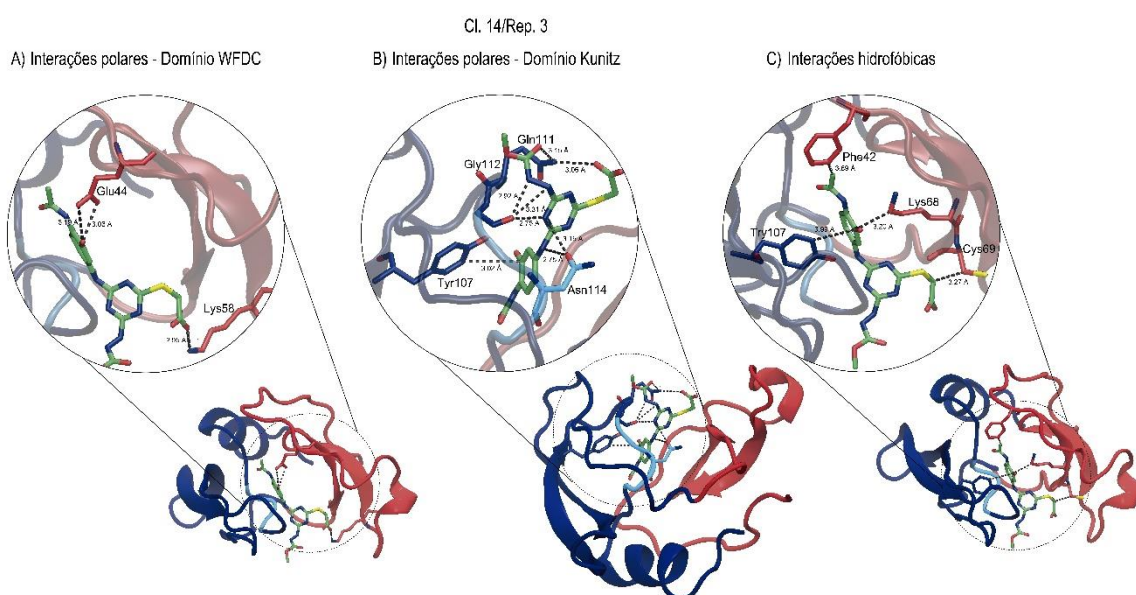


Figura 9. Interações polares e hidrofóbicas do Cl. 14/Rep 3. Interações polares dos resíduos (A) Glu44 e Lys58 do domínio WFDC (vermelho), e (B) Tyr107, Gln111, Gly112 e Asn 114 do domínio Kunitz (azul), ressaltando seq. Asn113-Asn116 (ciano). (C) Interações hidrofóbicas dos resíduos Phe42, Lys68, Cys69 do domínio WFDC e Tyr107 do domínio Kunitz.

O Cl. 1 apresentou 13 ligações polares e 4 ligações hidrofóbicas, no entanto apenas 3 três ligações ocorreram entre o domínio WFDC e o EP055. As demais ligações ocorreram entre o domínio Kunitz e o ligante, incluindo a região da seq. Asn113-Asn116 (6 interações). Em relação às interações polares, no domínio WFDC estabeleceu-se entre o resíduo: i. Cys69 com o grupo carboxílico ligado ao enxofre e ii. Asp71 com o grupamento cetona, todas as ligações provenientes da cadeia principal dos resíduos (Figura 10A). No domínio Kunitz, encontramos ligações entre as cadeias laterais dos resíduos: i. Asn114 com o grupamento cetona e fenol ligado ao anel aromático, por duas ligações, e ii. Glu82 com o anel triazínico. Entre as cadeias principais encontramos os resíduos: i. Gln111 com os nitrogênios que conectam o R2 e ii. Asn115 com o grupamento fenol do anel aromático (Figura 10B). Quanto às ligações

hidrofóbicas, as interações ocorreram apenas nas cadeias laterais dos resíduos. No domínio WFDC foram entre os resíduos: i. Leu70 com o grupamento acetil, e ii. Val76 com um metil. No domínio Kunitz, as ligações ocorreram dos resíduos i. Gln111 com o grupamento éster e ii. Asn113 e o anel aromático (Figura 10C). Avaliando os contatos estabelecidos entre os complexos ligante-receptor, no Cl. 14 o EP055 foi acomodado mais no interior do sítio de ligação, enquanto que no Cl. 1 o EP055 apresentou atracamento mais superficial (Tabela 3).

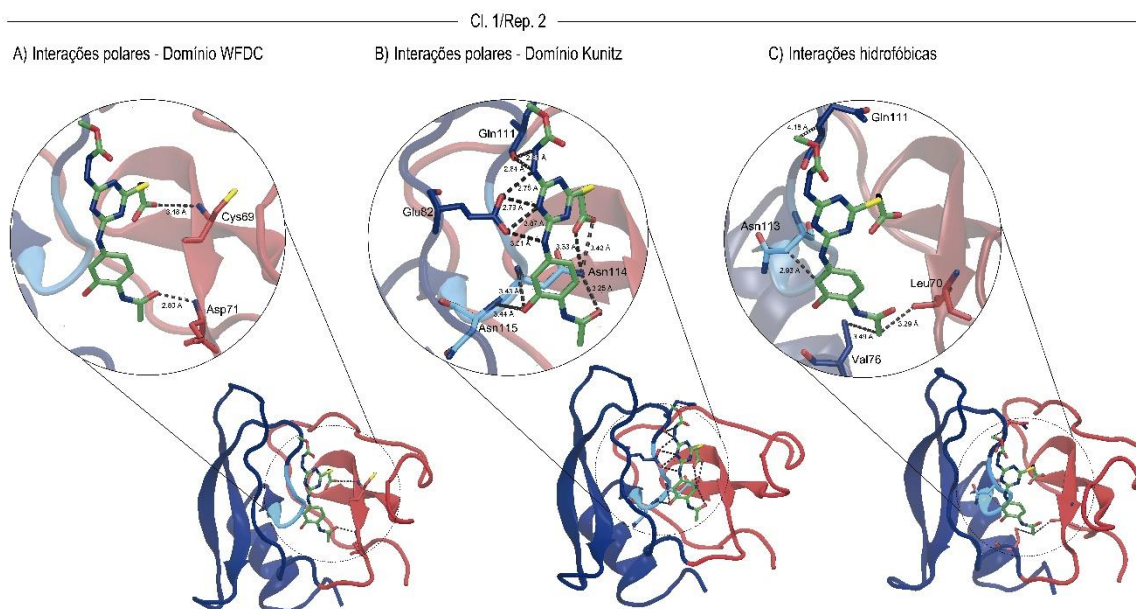


Figura 10. Interações polares e hidrofóbicas do Cl. 1/Rep 2. Interações polares dos resíduos (A) Cys 69 e Asp71 do domínio WFDC (vermelho), e (B) Glu82, Gln111, Gly112 e Asn 114, Asn 115 do domínio Kunitz (azul), ressaltando seq. Asn113-Asn116 (ciano). (C) Interações hidrofóbicas dos resíduos Leu70 do domínio WFDC e Val76, Gln111 e Asn 113 do domínio Kunitz, ressaltando seq. Asn113-Asn116 (ciano)

Tabela 1. Energia livre de ligação e nRP do ligante

Grupos	Energia livre de ligação (ΔG)										nRP				
	Menores energias					Energias do nRP									
	Rep1	Rep2	Rep3	Média	DP	Rep1	Rep2	Rep3	Média	DP	Rep1	Rep2	Rep3	Média	DP
1	-7,84	-7,25	-7,63	-7,573	0,30	-7,09	-6,89	-7,18	-7,05	0,15	17	20	14	17	3,00
2	-7,2	-8,12	-7,51	-7,61	0,47	-7,02	-8,12	-6,42	-7,19	0,86	11	17	11	13	3,46
3	-6,78	-7,32	-6,7	-6,93	0,34	-6,57	-7,32	-6,25	-6,71	0,55	11	8	9	9	1,53
4	-6,99	-6,93	-7,15	-7,02	0,11	-5,00	-5,96	-5,82	-5,59	0,52	9	9	13	10	2,31
5	-7,35	-7,7	-7,21	-7,42	0,25	-6,45	-5,88	-6,00	-6,11	0,30	7	10	9	9	1,53
6	-7,63	-7,51	-7,15	-7,43	0,25	-7,63	-7,15	-6,37	-7,05	0,64	14	13	10	12	2,08
7	-6,86	-6,5	-6,6	-6,65	0,19	-6,62	-5,62	-5,85	-6,03	0,52	11	16	8	12	4,04
8	-6,7	-6,76	-6,73	-6,73	0,03	-6,60	-5,91	-5,80	-6,10	0,43	10	11	8	10	1,53
9	-7,28	-7,38	-6,94	-7,20	0,23	-6,72	-6,35	-6,89	-6,65	0,28	12	13	12	12	0,58
10	-8,01	-7,12	-7,25	-7,46	0,48	-6,46	-6,60	-6,68	-6,58	0,11	17	19	12	16	3,61
11	-6,96	-7,77	-7,04	-7,26	0,45	-5,80	-5,53	-6,29	-5,87	0,39	11	11	9	10	1,15
12	-7,16	-6,86	-6,56	-6,86	0,30	-5,74	-5,01	-5,93	-5,56	0,49	8	8	7	8	0,58
13	-7,38	-7,23	-7,38	-7,33	0,09	-6,44	-7,13	-5,85	-6,47	0,64	14	19	13	15	3,21
14	-8,03	-7,22	-8,46	-7,90	0,63	-6,55	-6,27	-6,39	-6,40	0,14	12	15	12	13	1,73
15	-7,4	-7,3	-7,9	-7,53	0,32	-7,06	-6,99	-6,05	-6,70	0,56	9	18	13	13	4,51
16	-7,25	-7,18	-7,41	-7,28	0,12	-7,25	-5,69	-6,93	-6,62	0,82	16	11	15	14	2,65
17	-6,61	-7,78	-6,95	-7,11	0,60	-5,56	-6,75	-5,21	-5,84	0,81	10	11	11	11	0,58
18	-6,82	-6,95	-7,03	-6,93	0,11	-5,99	-5,58	-6,32	-5,96	0,37	10	12	10	11	1,15
19	-7,46	-7,64	-7,07	-7,39	0,29	-6,04	-5,80	-5,51	-5,78	0,27	10	9	9	9	0,58
20	-7,19	-7,33	-8,3	-7,61	0,60	-6,20	-5,95	-6,49	-6,21	0,27	8	8	10	9	1,15
21	-7,33	-6,93	-6,82	-7,03	0,27	-6,20	-6,38	-6,09	-6,22	0,15	13	12	10	12	1,53
22	-7,62	-7,78	-7,78	-7,73	0,09	-7,62	-5,52	-6,16	-6,43	1,08	10	9	12	10	1,53
23	-7,37	-8,3	-7,01	-7,56	0,67	-6,11	-5,19	-6,16	-5,82	0,55	11	9	11	10	1,15
24	-7,86	-7,03	-7,6	-7,50	0,42	-6,24	-6,88	-7,10	-6,74	0,45	10	9	12	10	1,53
25	-7,19	-7,84	-7,15	-7,39	0,39	-5,57	-6,54	-6,68	-6,26	0,60	9	12	12	11	1,73
26	-7,23	-7,9	-7,42	-7,52	0,35	-6,53	-7,90	-6,86	-7,10	0,72	18	11	14	14	3,51
27	-7,16	-6,78	-7,63	-7,19	0,43	-6,08	-6,15	-6,62	-6,28	0,29	8	13	10	10	2,52
28	-7,32	-6,75	-7,4	-7,16	0,35	-5,65	-6,75	-6,12	-6,17	0,55	9	9	8	9	0,58
29	-7,39	-7,43	-7,56	-7,46	0,09	-6,62	-6,81	-7,56	-7,00	0,50	9	12	14	12	2,52
30	-6,9	-6,74	-7,04	-6,89	0,15	-6,90	-5,83	-7,04	-6,59	0,66	15	11	13	13	2,00

*Menores energias livre do cluster 1 e 14;

**Valor da energia livre do Cl.1/Rep. 1 (Cl de maior nRP);

***Valores de nRP do Cl.1.

Tabela 2. Angulações e distâncias entre o centro de massa do EP055 e da Seq. Asn113-Asn116

Grupos	Ângulo	Distância entre o centro de massa do EP055 e da seq. Asn113-Asn116					
		Conformação de maior energia livre de ligação			Conformação com maior nRP do ligante		
		Rep1	Rep2	Rep3	Rep1	Rep2	Rep3
1	71,89	17,27	7,75	7,32	6,99	7,04	6,83
2	75,41	7,68	6,73	7,21	7,10	6,73	13,04
3	67,19	9,54	8,51	14,89	15,77	8,51	13,34
4	79,32	16,82	15,61	17,22	6,97	16,22	6,70
5	72,96	16,62	6,31	8,26	13,13	16,36	16,68
6	75,62	7,13	12,72	6,96	7,13	6,92	13,71
7	83,37	13,90	13,64	15,91	14,95	8,13	14,73
8	84,83	24,13	9,88	12,19	14,11	13,66	6,93
9	67,72	10,16	7,24	8,79	16,87	16,17	13,15
10	68,92	14,05	14,35	6,64	12,52	12,69	12,04
11	79,81	7,38	16,22	16,76	12,78	16,04	12,86
12	78,15	15,02	15,30	18,00	18,82	17,53	15,85
13	88,27	15,03	5,97	14,58	7,37	7,38	7,22
14	76,39	6,94	7,03	7,07	13,50	15,12	7,90
15	87,72	7,22	6,01	15,83	10,60	9,17	15,55
16	64,68	13,13	13,18	16,98	13,13	15,07	13,32
17	69,97	17,54	17,20	17,29	15,13	13,93	11,77
18	72,03	18,36	14,08	18,47	14,85	15,48	13,18
19	76,94	7,31	10,58	9,07	14,25	15,11	12,04
20	81,45	9,50	9,54	10,50	22,15	15,83	11,70
21	86,23	15,30	15,73	13,78	12,68	13,04	12,62
22	73,22	15,97	15,82	16,27	15,97	12,09	12,96
23	65,75	8,47	7,82	13,84	10,12	12,73	16,39
24	76,64	6,81	6,76	6,33	14,47	14,55	14,21
25	81,85	17,48	16,94	20,01	16,33	18,84	22,25
26	70,87	7,78	8,35	7,75	9,21	8,35	8,08
27	63,18	8,13	9,41	8,34	8,44	8,84	12,42
28	82,35	6,41	14,39	19,93	14,51	14,39	14,99
29	69,30	8,21	7,73	8,14	7,95	16,97	8,14
30	92,17	14,27	12,16	14,16	14,27	13,88	14,16

*Conformações mais fechadas (vermelho); **Conformações intermediárias (amarelo); ***Conformações mais abertas (verde).

Tabela 3. Distância em Å entre os resíduos da EPPIN e o EP055

Cluster	Tipo de Interação	Domínio EPPIN	Resíduos de interação	Distância em Å	Grupamento orgânico
Cl.14/Rep.3	Interações polares	WFDC	Glu 44	3.19	Fenol do anel aromático
				3.06	Fenol do anel aromático
			Lys58	2.95	Ácido carboxílico ligado ao enxofre
		Kunitz	Tyr107	3.02	Fenol do anel aromático
				3.15	Anel triazínico
			Asn114	2.75	Nitrogênio que conecta o anel aromático-triazínico
				3.15	Éster
			Gln111	3.06	Ácido carboxílico ligado ao enxofre
				2.75	Anel triazínico
			Gly112	3.31	Nitrogênio (1) que conecta o R2
				2.92	Nitrogênio (2) que conecta o R2
	Interações hidrofóbicas	WFDC	Phe42	3.89	Acetil do anel aromático
			Lys68	3.20	Fenol do anel aromático
			Cys69	3.27	Carbono entre o grupo carboxílico e o enxofre
		Kunitz	Tyr107	3.99	carbono do anel aromático
Cl.1/Rep.2	Interações polares	WFDC	Cys69	3.48	Ácido carboxílico ligado ao enxofre
			Asp71	2.80	Cetona
				3.25	Cetona
		Kunitz		3.33	Ácido carboxílico ligado ao enxofre
			Asn114	3.42	Ácido carboxílico ligado ao enxofre
				3.43	Fenol ligado ao anel aromático
				3.01	Nitrogênio que conecta o anel aromático-triazínico
			Glu82	2.87	Anel triazínico
				2.79	Anel triazínico
				2.75	Nitrogênio (1) que conecta o R2
			Gln111	2.84	Nitrogênio (1) que conecta o R2
				2.63	Nitrogênio (2) que conecta o R2
			Asn115	3.44	Fenol do anel aromático
	Interações hidrofóbicas	WFDC	Leu70	3.29	Acetil
			Val76	3.49	Metil
		Kunitz	Gln111	4.18	Éster
			Asn113	2.93	Anel aromático

DISCUSSÃO

Os altos índices de gestações não planejadas e seus impactos na saúde, econômicos e sociais para as mulheres e suas famílias enfatizam a necessidade de novos métodos para o controle da natalidade. Devido à limitação nas opções disponíveis (preservativo e vasectomia), o desenvolvimento de métodos contraceptivos para homens ainda é mais urgente. Estimativas indicam que a entrada de um novo contraceptivo masculino no mercado poderá reduzir as gestações não planejadas em até 5,2% e 38% em países desenvolvidos e em desenvolvimento, respectivamente (Dorman *et al.*, 2018). Neste estudo, demonstramos que o alvo espermático para contracepção masculina EPPIN permanece associado ao espermatozoide durante o processo de aquisição de motilidade e capacitação *in vivo*. Além disso, confirmamos a colocalização da EPPIN com suas potenciais parceiras GAPDHS e AKAP4 no flagelo do espermatozoide, o que sustenta a hipótese de que essas interações podem ocorrer enquanto o espermatozoide avança pelo trato reprodutor feminino. Do ponto de vista estrutural, identificamos que o bolsão de interação da EPPIN com ligantes de baixo peso molecular envolve ambos os domínios WFDC e Kunitz. Esses resultados fornecem novas perspectivas para as funções fisiológicas da EPPIN, sua aplicação como alvo para contracepção masculina por perda da função do espermatozoide ejaculado, bem como o desenho racional de novos ligantes com aplicações terapêuticas em contracepção masculina.

Aspectos celulares da EPPIN no espermatozoide durante a capacitação in vivo e in vitro

Considerando achados anteriores do nosso grupo, que indicaram a potencial interação entre a EPPIN e a GAPDHS e AKAP4, bem como a relevância dessas proteínas para a modulação da motilidade espermática e fertilidade masculina (Hughes *et al.*, 2009; Mariani *et al.*, 2020; Miki, Qu, Goulding, Eugenia H., *et al.*, 2004; O’Rand *et al.*, 2004, 2009), conduzimos ensaios de imunofluorescência em espermatozoides capacitados *in vitro* e *in vivo*, coletados da cauda do epidídimo e de diferentes regiões do trato reprodutor feminino, respectivamente. Os espermatozoides que apresentaram imunomarcagem positiva para essas proteínas foram submetidos a análises de colocalização durante a maturação pós-testicular. O processo de maturação espermática pós-testicular é caracterizado por modificações no conteúdo proteico do espermatozoide, as quais são essenciais para que o gameta masculino atinja seu ápice funcional para o processo de fertilização. Observamos estabilidade da imunomarcagem positiva para a EPPIN na cabeça e flagelo de espermatozoides isolados de diferentes regiões do trato reprodutor feminino (vagina, útero e oviduto) em relação aos isolados da cauda do epidídimo. Esses resultados mostram que a EPPIN permanece associada ao espermatozoide durante toda a maturação espermática pós-testicular, indicando seu possível envolvimento nesse processo em etapas pré- e pós-ejaculatórias, bem como confirma sua

acessibilidade para manipulação farmacológica após a entrada no gameta masculino no trato reprodutor feminino. Assim, trata-se de um resultado relevante para aplicação da EPPIN como alvo para contracepção masculina, pois confirma sua disponibilidade para interação com ligantes durante a jornada do gameta masculino pelo trato reprodutor feminino. Esses dados também ampliam o leque de possibilidades para estratégias contraceptivas focadas na EPPIN, visto que permite o desenvolvimento de métodos unissex de controle da natalidade.

As proteínas parceiras da EPPIN, a GAPDHS e AKAP4 também foram conservadas no espermatozoide durante seu percurso até o local de fertilização, destacando a importância de cada uma para o desempenho de seus respectivos papéis no fornecimento energético e estrutura do espermatozoide. (Baccetti *et al.*, 2005; Bunch *et al.*, 1998; Miki, Qu, Goulding, Eugenia H., *et al.*, 2004; Moretti *et al.*, 2007). Dessa forma, esses achados sustentam nossos resultados anteriores, que identificaram a GAPDHS e AKAP4 como potenciais parceiras de interação da EPPIN no espermatozoide murino, ressaltando o papel da EPPIN como um centro de IPPS com relevância para a função espermática. É interessante notar que a AKAP4 está localizada na bainha fibrosa do espermatozoide (Miki *et al.*, 2002), um compartimento intracelular importante para sua estrutura, evidenciando a participação da EPPIN na interação com proteínas associadas a diferentes compartimentos celulares, além da superfície do espermatozoide. De acordo com Silva et al 2021, a EPPIN está associada tanto à membrana plasmática quanto às frações celulares solúveis, ligadas a organelas e estruturas do citoesqueleto do espermatozoide murino (Silva et al., 2021). A utilização da imunofluorescência como estratégia experimental na análise da colocalização dessas proteínas não nos permite confirmar a interação direta entre a EPPIN e a GAPDHS e AKAP4, porém representa um estímulo para novos ensaios que validem essas interações, permitindo estabelecer a relação entre estrutura e função da EPPIN e suas parceiras de interação e seu impacto na função espermática.

Em conjunto, nossos resultados representam um passo adicional no entendimento do papel fisiológico da EPPIN, reforçando sua utilização como alvo de ligantes com potencial contraceptivo. Além disso, eles enriqueceram a respeito da localização da EPPIN com suas potenciais proteínas parceiras no espermatozoide, assumindo novas perspectivas para o entendimento da aplicação de IPPs como estratégias farmacológicas para o desenvolvimento de um contraceptivo masculino não-hormonal.

Análise de modelagem molecular da EPPIN

Um aspecto limitante do estudo estrutural da EPPIN como alvo farmacológico é a carência de estudos experimentais. Até o momento, a estrutura da EPPIN só foi estudada utilizando modelos obtidos por homologia, que selecionaram proteínas homólogas com estrutura determinada

experimentalmente como moldes para prever seu modelo tridimensional (O’Rand, Silva e Hamil, 2016; Shan *et al.*, 2019; Silva, Hamil, *et al.*, 2012). Apesar de permitir análises estruturais relevantes da EPPIN, a modelagem por homologia apresenta limitações, como baixa acurácia e cobertura do modelo gerado, em decorrência de vieses e conservação variável da sequência de aminoácidos entre o alvo e a proteína molde, dificuldade na construção de modelos de proteínas com diferentes domínios estruturais, e eventuais ausência de dados experimentais robustos que permitam uma modelagem de alto nível de confiança (Lee, Su e Jane Tseng Corresponding author Tseng, 2022). Neste estudo, propomos utilizar a recém desenvolvida plataforma de inteligência artificial AlphaFold, que revolucionou o estudo estrutural de proteínas (Jumper *et al.*, 2021; Terwilliger *et al.*, 2022), como ferramenta para estudar aspectos conformacionais da EPPIN. O AlphaFold realiza predição de modelos estruturais de proteínas utilizando somente a sua sequência primária de aminoácidos e, a partir de aprendizagem de máquina que opera uma grande base de dados experimentais.

O modelo estrutural da EPPIN predito pelo AlphaFold evidenciou estruturas secundárias de ambos os domínios, assim como todas as pontes dissulfeto características dos domínios de inibidores de protease do tipo WFDC e Kunitz (Richardson, Richard T. *et al.*, 2001). Além disso, a alta confiança observada para ambos os domínios, WFDC e Kunitz, como demonstrada pelos indicadores fornecidos pelo AlphaFold após a predição do modelo, sugerem um uso adequado dessa estrutura predita para o estudo da interação ligante-receptor. Outra informação importante relacionada ao modelo predito do AlphaFold foi a apresentação do peptídeo sinal (Met1-Gln21) com baixo índice de confiança (Figura 5). Considerando que a EPPIN é uma proteína de secreção, o peptídeo sinal é clivado durante sua maturação, sendo a forma contendo apenas os domínios WFDC e Kunitz, a que interage com o espermatozoide e, portanto, de maior relevância biológica (Richardson, Richard T. *et al.*, 2001; Silva, Patrão, *et al.*, 2012). Dessa forma, utilizamos o modelo da EPPIN inteira, porém sem o peptídeo sinal nos estudos subsequentes.

A conformação inicial predita da EPPIN apresentou proximidade entre os domínios WFDC e Kunitz, formando uma estrutura fechada. A utilização da DM-MNE foi importante para explorar aspectos, como a flexibilidade dos domínios. Embora a MD-MNE aumente a exploração conformacional de proteínas, a movimentação entre os domínios da EPPIN não apresentou grande flexibilidade, como demonstrado pela baixa angulação entre os domínios, o que indica certa rigidez na sua estrutura. Estudos estruturais também reforçam essa conformação fechada, bem como reitera certa rigidez entre domínios, por meio da dinâmica molecular livre (Shan *et al.*, 2019). No entanto, ao analisarmos os 30 clusters da EPPIN gerados em nosso estudo, conseguimos classificá-los em diferentes estruturas: i. mais fechadas, ii. intermediárias e iii. mais abertas. Na tentativa de explorar ainda mais essas diferentes conformações da EPPIN, utilizamos a seq. Asn113-Asn116 como

referência, descrita experimentalmente como importante para interação da EPPIN com suas proteínas parceiras e com compostos de baixo peso molecular (O’Rand, Silva e Hamil, 2016; Shan *et al.*, 2019; Silva, Hamil, *et al.*, 2012). As conformações mais fechadas não expuseram essa sequência ao solvente, deixando-a inacessível para potenciais ligantes. Já as conformações mais abertas, embora tenham exposto a seq. Asn113-Asn116 ao solvente, não apresentaram esta sequência delimitando a superfície de um possível sítio de ligação às biomoléculas, devido ao afastamento entre os domínios WFDC e Kunitz. Sabe-se que este tipo de característica estrutural geralmente dificulta a acomodação de ligantes a superfícies de proteínas. Dessa forma, as estruturas intermediárias da EPPIN fornecem conformações estruturais relevantes para serem avaliadas no atracamento com ligantes, visto que a seq. Asn113-Asn116 delimita uma cavidade interessante entre os domínios WFDC e Kunitz capaz estabilizar mais facilmente uma molécula.

Sabendo-se que foi demonstrado experimentalmente que a EPPIN interage com ligantes endógenos (ex. SEMG1) e exógenos (EP055 e EP012), impactando negativamente a motilidade espermática (O’Rand *et al.*, 2018; Silva, Hamil e O’Rand, 2013). A etapa de atracamento molecular do EP055, protótipo dos ligantes experimentais da EPPIN (O’Rand *et al.*, 2018), com as 30 conformações estruturais da EPPIN foi realizada para entender com mais detalhes características dessas interações. Após a seleção de dois complexos EPPIN/EP055, utilizando como parâmetro o cluster que apresentou a menor energia livre de ligação (Cl. 14/Rep. 3) e o que demonstrou maior repetição da posição do ligante (Cl. 1/Rep. 2), analisamos os principais resíduos envolvidos na superfície de contato da EPPIN com o EP055. Nessa análise evidenciamos o domínio Kunitz como importante na interação com EP055, mostrando resíduos como Tyr107, Gln111, Gly112, Asn113, Asn114 e Asn115. Estudos anteriores de atracamento molecular da EPPIN com ligantes endógenos e exógenos também ressaltaram parte desses resíduos como importantes para formação do sítio de ligação e estabilização de ligantes, especialmente os resíduos aromáticos Tyr107 e Phe117, e os resíduos Cys102, Cys110, Gln111 e Asn114 (O’Rand, Silva e Hamil, 2016; Silva, Hamil, *et al.*, 2012). Todos estes localizados no domínio Kunitz da EPPIN. A abertura das conformações da EPPIN, nos nossos clusters selecionados, favoreceu a acomodação do EP055 em regiões mais profundas do sítio de ligação, estabelecendo resíduos de contatos mais internos do domínio Kunitz que auxiliam em uma maior estabilidade do ligante no sítio de ligação. Shan *et al.*, 2019 identificaram os resíduos C-terminais da EPPIN Asn122, Asn125 e Thr126 como importantes para a ligação do EP055 (Shan *et al.*, 2019). Essa diferença em relação aos nossos resultados provavelmente ocorre pela menor abertura do bolsão de interação no modelo por homologia gerado por Shan *et al.*, o que resultou em uma ligação mais superficial do EP055 à EPPIN. Vale ressaltar que nossos resultados encontram lastro na literatura, visto que a mutação do resíduo Tyr107 resultou na redução da interação da EPPIN

com a SEMG1 em cerca de 80%, enfatizando a importância desse resíduo para essa interação (Silva, Hamil, et al., 2012). Os resíduos Tyr107, Asn113 e Asn114 já foram demonstrados estabelecendo ligações de hidrogênio de distância próxima a 2Å entre a EPPIN e o peptídeo da SEMG1 (O’Rand, Silva e Hamil, 2016). Além disso, é sabido que o composto EP055 compete com o anticorpo anti-EPPIN S21C, que reconhece o epítipo Ser103-Cys123, pela interação com a EPPIN (O’Rand *et al.*, 2018).

Além dos contatos estabelecidos entre o EP055 e o domínio Kunitz (C-terminal) da EPPIN, nossos resultados também demonstraram um papel importante do domínio WFDC (N-terminal) por meio de interações polares e hidrofóbicas com o EP055, ilustrando uma contribuição de ambos os domínios para a formação do sítio de interação com ligantes da EPPIN. A contribuição do domínio WFDC para a função da EPPIN é sustentada pela utilização de anticorpos Q20E que se ligam na região N-terminal da EPPIN e modulação sua função, inibindo a motilidade e hiperativação espermática em modelos experimentais murinos (Silva *et al.*, 2021).

Nosso trabalho, sobre a perspectiva estrutural apontou conformações ótimas da EPPIN para a acomodação com ligantes, além de demonstrar resíduos importantes de seus ambos os domínios na interface de interação com o ligante EP055. Assim, estes resultados fornecem melhor compreensão estrutural e funcional da EPPIN, aumentando o seu interesse de exploração farmacológica como alvo promissor para a contracepção masculina não-hormonal. Ainda, este trabalho ressalta a demanda por novos estudos que utilizem de estratégias para simular a EPPIN em solução, a fim de obter novas trajetórias estruturais a serem exploradas.

CONCLUSÃO

Mostramos o papel da EPPIN e suas potenciais proteínas de interação, GAPDHS e AKAP4, em eventos pós-testiculares, como motilidade, hiperativação e capacitação. A colocalização da EPPIN com a GAPDHS e a AKAP4 sugere que essas potenciais interações proteína-proteína podem modular a motilidade e capacitação espermática por múltiplos mecanismos. Assim como a estrutura da EPPIN pode apresentar conformações diferentes, caracterizando um potencial sítio de ligação que acomoda pequenas moléculas orgânicas, como o EP055, com impacto na motilidade espermática. Por fim, nossos resultados sugerem que a EPPIN participa como elemento chave de novas vias de interação proteína-proteína assim como ligante-receptor que podem ser explorados para o desenvolvimento de novas estratégias contraceptivas masculinas.

ANEXO I

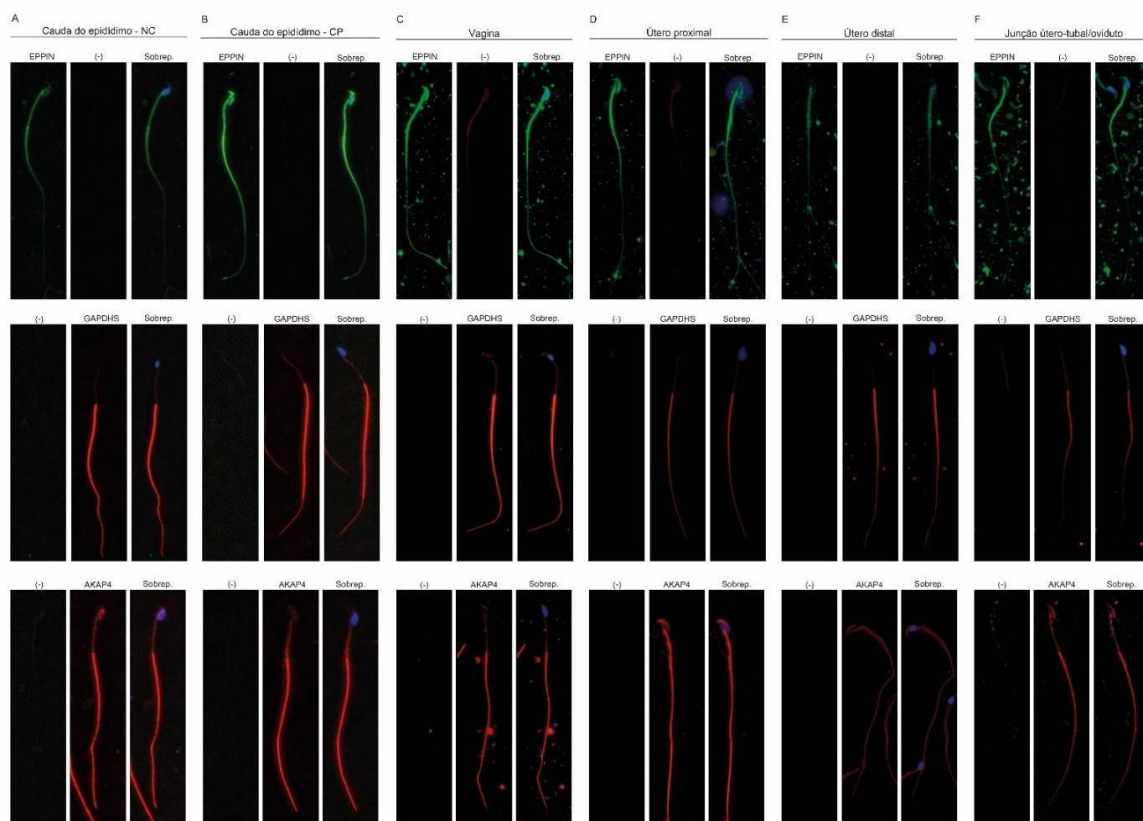


Figura S1. Ensaios de controle negativo na ausência de anticorpo primário (-). Painéis superiores apresentam os controles negativos para GAPDH e AKAP4 na presença de imunomarcação da EPPIN. Painéis medianos apresentam os controles negativos para EPPIN na presença de imunomarcação da GAPDH. Painéis inferiores apresentam os controles negativos para EPPIN na presença de imunomarcação da AKAP4. Foram observados espermatozoides isolados da cauda do epidídimo em meio não capacitante (A) e capacitante (B); e espermatozoides isolados de diferentes porções do trato reprodutor feminino: vagina (C), útero proximal (D), útero distal (E) e junção útero-tubal/oviduto (F). Sobreposição com DAPI (azul). NC espermatozoides não capacitados. CP: espermatozoides capacitados. Sobrep.: Sobreposição. Resultados representativos de três experimentos independentes. Barra de escala: 50 μ m.

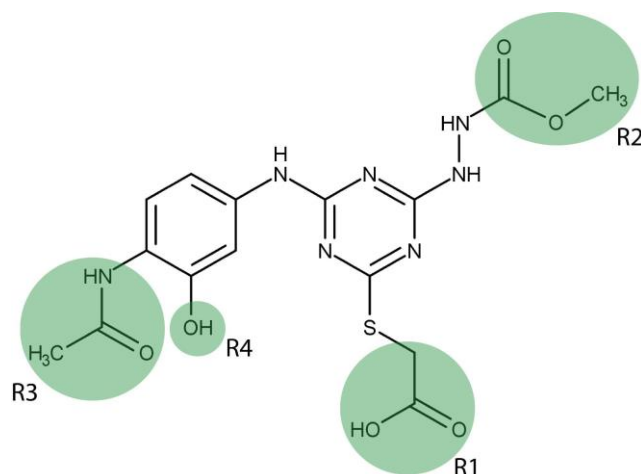


Figura S2. Designação dos radicais do ligante EP055. R1: CH_2COOH ; R2: COOCH_3 ; R3: NHCOCH_3 ; R4: OH

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ÅHMAN, ELISABETH. *et al.* **Unsafe abortion: global and regional estimates of the incidence of unsafe abortion and associated mortality in 2008.** [s.l.] World Health Organization, 2011.
- AITKEN, R. J. *et al.* As the world grows: contraception in the 21st century. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1330–1343, 1 abr. 2008.
- BACCETTI, B. *et al.* Gene deletions in an infertile man with sperm fibrous sheath dysplasia. **Human Reproduction**, v. 20, n. 10, p. 2790–2794, 2005.
- BAEK, M. *et al.* Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. **Science**, v. 373, n. 6557, p. 871–876, 20 ago. 2021.
- BROOKS, B. R. *et al.* CHARMM: The biomolecular simulation program. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 10, p. 1545–1614, 30 jul. 2009.
- BUNCH, D. O. *et al.* Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase-S Protein Distribution during Mouse Spermatogenesis. **Biology of Reproduction**, v. 58, n. 3, p. 834–841, 1 mar. 1998.
- BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, p. 014101, 3 jan. 2007.
- COSTA, M. G. S. *et al.* Exploring Free Energy Landscapes of Large Conformational Changes: Molecular Dynamics with Excited Normal Modes. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 6, p. 2755–2767, 9 jun. 2015.
- DORMAN, E. *et al.* Modeling the impact of novel male contraceptive methods on reductions in unintended pregnancies in Nigeria, South Africa, and the United States. **Contraception**, v. 97, n. 1, p. 62–69, 1 jan. 2018.
- ESLAMI, H.; MOJAHEDI, F.; MOGHADASI, J. Molecular dynamics simulation with weak coupling to heat and material baths. **The Journal of Chemical Physics**, v. 133, n. 8, p. 084105, 25 ago. 2010.
- FANG, X. *et al.* Proteomics and single-cell RNA analysis of Akap4-knockout mice model confirm indispensable role of Akap4 in spermatogenesis. **Developmental Biology**, v. 454, n. 2, p. 118–127, 15 out. 2019.
- GAGNON, R. *et al.* Changes in surfactant-associated protein mRNA profile in growth- restricted fetal sheep. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 276, n. 3 20-3, 1999.
- GERVASI, M. G.; VISCONTI, P. E. Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. **Andrology**, v. 5, n. 2, p. 204–218, 1 mar. 2017.
- GRANT, B. J. *et al.* Bio3d: an R package for the comparative analysis of protein structures. **Bioinformatics**, v. 22, n. 21, p. 2695–2696, 1 nov. 2006.
- HOOVER, W. G. Canonical dynamics: Equilibrium phase-space distributions. **Physical Review A**, v. 31, n. 3, p. 1695, 1 mar. 1985.
- HUANG, J. *et al.* CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature Methods** **2016 14:1**, v. 14, n. 1, p. 71–73, 7 nov. 2016.
- HUGHES, L. M. *et al.* The spermostatic and microbicidal actions of quinones and maleimides: toward a dual-purpose contraceptive agent. **Molecular pharmacology**, v. 76, n. 1, p. 113–124, jul. 2009.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN, K. VMD: Visual molecular dynamics. **Journal of Molecular Graphics**, v. 14, n. 1, p. 33–38, 1 fev. 1996.
- JO, S. *et al.* CHARMM-GUI: A web-based graphical user interface for CHARMM. **Journal of Computational Chemistry**, v. 29, n. 11, p. 1859–1865, 1 ago. 2008.

- JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583–589, 26 ago. 2021.
- KAWANO, N.; YOSHIDA, M. Semen-coagulating protein, SVS2, in mouse seminal plasma controls sperm fertility. **Biology of Reproduction**, v. 76, n. 3, p. 353–361, mar. 2007.
- LEE, C.; SU, B.-H.; JANE TSENG CORRESPONDING AUTHOR TSENG, Y. Y. Comparative studies of AlphaFold, RoseTTAFold and Modeller: a case study involving the use of G-protein-coupled receptors. **Briefings in Bioinformatics**, v. 23, n. 5, p. 1–7, 20 set. 2022.
- MALDE, A. K. *et al.* An Automated force field Topology Builder (ATB) and repository: Version 1.0. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 12, p. 4026–4037, 13 dez. 2011.
- MARIANI, N. A. P. Proteínas de interação da EPPIN no espermatozoide de camundongos: identificação, expressão e potenciais papeis fisiológicos. 30 ago. 2019.
- MARIANI, N. A. P. *et al.* Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is a protein hub for seminal vesicle-secreted protein SVS2 binding in mouse spermatozoa. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 506, 15 abr. 2020.
- MARTIN, C. W. *et al.* Potential impact of hormonal male contraception: cross-cultural implications for development of novel preparations. **Human Reproduction**, v. 15, n. 3, p. 637–645, 1 mar. 2000.
- MIKI, K. *et al.* Targeted disruption of the Akap4 gene causes defects in sperm flagellum and motility. **Developmental Biology**, v. 248, n. 2, p. 331–342, 2002.
- MIKI, K.; QU, W.; GOULDING, EUGENIA H; *et al.* **Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-S, a sperm-specific glycolytic enzyme, is required for sperm motility and male fertility.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0407708101>.
- MIKI, K.; QU, W.; GOULDING, EUGENIA H.; *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 of the United States of America**, v. 101, n. 47, p. 16501–16506, 23 nov. 2004.
- MORETTI, E. *et al.* Localization of AKAP4 and tubulin proteins in sperm with reduced motility. **Asian Journal of Andrology**, v. 9, n. 5, p. 641–649, set. 2007.
- MORRIS, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785, dez. 2009.
- NOSÉ, S. A molecular dynamics method for simulations in the canonical ensemble. <http://dx.doi.org/10.1080/00268978400101201>, v. 52, n. 2, p. 255–268, 2006.
- OLSSON, M. H. M. *et al.* PROPKA3: Consistent treatment of internal and surface residues in empirical p K a predictions. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 7, n. 2, p. 525–537, 8 fev. 2011.
- O’RAND, M. G. *et al.* Reversible immunocontraception in male monkeys immunized with Eppin. **Science**, v. 306, n. 5699, p. 1189–1190, 12 nov. 2004.
- O’RAND, M. G. *et al.* Eppin: An effective target for male contraception. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 250, n. 1–2, p. 157–162, 16 maio 2006.
- O’RAND, M. G. *et al.* Inhibition of human sperm motility by contraceptive anti-eppin antibodies from infertile male monkeys: Effect on cyclic adenosine monophosphate. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 2, p. 279–285, fev. 2009.
- O’RAND, M. G. *et al.* **Epididymal protein targets: A review brief history of the development of epididymal protease inhibitor as a contraceptive** **Journal of Andrology**, nov. 2011.
- O’RAND, M. G. *et al.* Inhibition of sperm motility in male macaques with EP055, a potential non-hormonal male contraceptive. **PLOS ONE**, v. 13, n. 4, p. e0195953, 19 abr. 2018.

- 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 and Therapeutics* Elsevier Inc., , 1 jan. 2016.
- O'RAND, M. G.; WIDGREN, E. E. Loss of calcium in human spermatozoa via EPPIN, the semenogelin receptor. **Biology of Reproduction**, v. 86, n. 2, 1 fev. 2012.
- RICHARDSON, RICHARD T *et al.* Cloning and sequencing of human Eppin: A novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. **Gene**, v. 270, n. 1–2, p. 93–102, maio 2001.
- RICHARDSON, RICHARD T. *et al.* Cloning and sequencing of human Eppin: A novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. **Gene**, v. 270, n. 1–2, p. 93–102, 30 maio 2001.
- ROTH, M. Y.; AMORY, J. K. Beyond the Condom: Frontiers in Male Contraception. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 34, n. 3, p. 183–190, 4 mar. 2016.
- SEDGH, G.; SINGH, S.; HUSSAIN, R. Intended and Unintended Pregnancies Worldwide in 2012 and Recent Trends. **Studies in Family Planning**, v. 45, n. 3, p. 301–314, 1 set. 2014.
- SHAN, C. *et al.* Binding interactions of epididymal protease inhibitor and semenogelin-1: A homology modeling, docking and molecular dynamics simulation study. **PeerJ**, v. 2019, n. 8, 2019.
- SILVA, A. A. S. *et al.* Dissecting EPPIN protease inhibitor domains in sperm motility and fertilizing ability: Repercussions for male contraceptive development. **Molecular Human Reproduction**, v. 27, n. 12, 1 dez. 2021.
- SILVA, E. J. R.; HAMIL, K. G.; *et al.* Characterization of EPPIN's semenogelin i binding site: A contraceptive drug target. **Biology of Reproduction**, v. 87, n. 3, 1 set. 2012.
- SILVA, E. J. R.; PATRÃO, M. T. C. C.; *et al.* Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is differentially expressed in the male rat reproductive tract and immunolocalized in maturing spermatozoa. **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, n. 12, p. 832–842, dez. 2012.
- 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, 2 dez. 2013.
- SKJAERVEN, L. *et al.* Integrating protein structural dynamics and evolutionary analysis with Bio3D. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 10 dez. 2014.
- SØNDERGAARD, C. R. *et al.* Improved Treatment of Ligands and Coupling Effects in Empirical Calculation and Rationalization of pKa Values. **Journal of chemical theory and computation**, v. 7, n. 7, p. 2284–2295, 12 jul. 2011.
- TERWILLIGER, T. C. *et al.* Improved AlphaFold modeling with implicit experimental information. **Nature Methods** 2022 **19:11**, v. 19, n. 11, p. 1376–1382, 20 out. 2022.
- VARADI, M. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D439–D444, 7 jan. 2022.
- WANG, Z. *et al.* Association of Eppin with semenogelin on human spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 72, n. 5, p. 1064–1070, maio 2005.
- WANG, Z. *et al.* Characterization of an eppin protein complex from human semen and spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 77, n. 3, p. 476–484, set. 2007.