

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

EFEITOS DA RESTRIÇÃO PROTEICA MATERNA SOBRE O  
DESENVOLVIMENTO DO DUCTO MESONÉFRICO E DO  
EPIDÍDIMO NAS FASES INICIAIS EM RATOS WISTAR

**TALITA DE MELLO SANTOS**

**PROFA DRA RAQUEL FANTIN DOMENICONI**  
**PROF DR LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA CHUFFA**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutora no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biologia Celular Estrutural e Funcional*.

*Profa Dra Raquel Fantin Domeniconi*

**BOTUCATU – SP**  
**2019**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeitos da Restrição Proteica Materna sobre o Desenvolvimento do  
Ducto Mesonéfrico e do Epidídimo nas Fases Iniciais em Ratos *Wistar*

**TALITA DE MELLO SANTOS**

*Profa Dra Raquel Fantin Domeniconi*  
*Prof Dr Luiz Gustavo De Almeida Chuffa*

**BOTUCATU – SP**  
**2019**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: LUCIANA PIZZANI-CRB 8/6772

Santos, Talita de Mello.

Efeitos da restrição proteica materna sobre o desenvolvimento do ducto mesonéfrico e do epidídimo nas fases iniciais em ratos Wistar / Talita de Mello Santos. - Botucatu, 2019

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Raquel Fantin Domeniconi  
Coorientador: Luiz Gustavo de Almeida Chuffa  
Capes: 20600003

1. Epidídimo. 2. Desenvolvimento fetal. 3. Deficiência de proteína. 4. Receptores hormonais.

Palavras-chave: Desenvolvimento epididimário; Fatores de crescimento; Programação fetal; Receptores hormonais; Restrição proteica.

Pelo amor, pela inspiração, por toda a saudade,

dedico este trabalho aos meus avós maternos Iná e

Wilson, e paternos Milxe e Laudelino.

# *Agradecimientos*

Não é fácil lidar com o desconhecido sem ter fé que todo o esforço será recompensado e principalmente sem acreditar em Deus. Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria então menor a cada gota que lhe faltasse. Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido a oportunidade de chegar aonde estou e por ter me dado sabedoria para lidar com as dificuldades.

Agradeço ao programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada, ao Instituto de Biociências de Botucatu e a UNESP pela estrutura e apoio para a realização deste trabalho, e a CAPES pelo suporte financeiro.

Á todos os mestres que fizeram parte da minha formação acadêmica e, em especial, aos professores do departamento de Anatomia do IBB e aos professores da banca pela dedicação e profissionalismo. Com respeito, agradeço a minha orientadora, Professora Raquel Fantin Domeniconi por confiar em meu trabalho, ter me dado à oportunidade de crescer profissionalmente, pela paciência, pelo suporte intelectual e pela sua alegria que contagia os que com ela convivem. Exemplo de mulher e profissional que por muitas vezes com carinho me aconselhou, me apoiou e me espelhou também em minha vida pessoal. Ao meu coorientador Professor Luiz Gustavo de Almeida Chuffa, sou muito grata por ter me acolhido e me dado suporte em todos os momentos que precisei, foi um prazer trabalhar e conviver com um ser tão inteligente, profissional e alto-astrol. Como disse Isaac Newton, se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.

Aos colegas do departamento de Anatomia, sou grata pelo apoio nos experimentos e auxílio no dia a dia, e também pelos momentos de risada e descontração em nosso laboratório. Anos de convivência que nos tonaram amigos. Em especial, a minha colega de doutorado e amiga Marília, a qual sem dúvida alguma, foi fundamental em todos esses anos. Ao longo desses quatro anos aprendi a respeitar mais os limites e as diferenças, e seu exemplo foi fundamental para isso. Sofremos e choramos, demos risadas e aproveitamos cada momento, incluindo o friozinho de Montreal e margueritas em Cancún. Obrigada por ser quem és. As minhas amigas Carina e Aninha, as quais participaram diariamente da minha vida profissional e pessoal, gratidão por serem tão importantes e especiais, cada uma em seu modo de ser.

Gostaria de agradecer também o Professor Barry Hinton da Universidade da Virginia pela oportunidade profissional dada a mim. Além disso, pela primeira vez tanto tempo longe de casa, em um país diferente, outra língua e cultura, fui acolhida por pessoas tão especiais como o Prof Hinton e sua família. Tenho certeza de que esta experiência me fez crescer muito em minha vida profissional e também como ser humano.

Este momento jamais seria o mesmo sem o apoio, o exemplo e incentivo da minha família. Minha mãe Silvia, meu pai Jádi, meu tio Júnior e meu padrasto Edson, que estiveram ao meu lado em todos os momentos me dando amor, suporte emocional, confiança e apoio financeiro. Não tenho palavras para dizer o quanto eu amo vocês e o tamanho da minha gratidão. Espero que possa ser orgulho e retribuir tudo o que fizeram e fazem por mim.

Tenho a sorte de viver rodeada de amor, carinho, incentivo e amizade. Aos meus amigos, que estão presentes fisicamente ou virtualmente nos diversos momentos da minha vida, minha gratidão. Minhas amigas de morada Ketlin e Priscila, minha professora de inglês Anita, nossa IC Dhrielly e a tantos encontros, que de alguma forma fizeram parte desses mais de 10 anos em Botucatu, meu carinho. Seria difícil e injusto exemplificar cada um. Sei que cada um sabe o que significa para mim e o quão foram e são importantes para tornar os meus dias mais leves e alegres. Um sorriso pode mudar um dia e por isso sou grata a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse sonho. Muito obrigada!

*“Quanto mais eu estudo a natureza,  
mais me maravilho com a obra do Criador.”*

*(Louis Pasteur)*



# SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	11
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
Aspectos Gerais da Desnutrição Materna e o Desenvolvimento Fetal .....	18
Origem do Desenvolvimento da Saúde e de Doenças e a Restrição Proteica .....	19
Restrição Proteica Materna e o Sistema Genital Masculino .....	21
Epidídimo .....	23
Morfogênese Epididimária .....	26
<b>CAPÍTULOS</b> .....	37
<b>CAPÍTULO I</b> .....	39
Maternal Low-Protein Diet During Gestation and Lactation Causes Estrogenization and lead to an Impairment an Epididymal Development in the Early Postnatal Development of Male Rat Offspring. ....	40
Abstract .....	40
1. Introduction.....	41
2. Material And Methods.....	42
3. Results .....	46
4. Discussion And Conclusion.....	55
5. References.....	61
<b>CAPÍTULO II</b> .....	68
Maternal Protein Restriction Modulates Angiogenesis and AQP9 Expression leading to a Delay in Postnatal Epididymal Development in Rat .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Abstract .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
1. Introduction.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2. Material And Methods.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3. Results .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4. Discussion.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5. Conclusion .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
REFERENCES .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>CAPÍTULO III</b> .....	94
Dieta Materna de Baixa Proteína modula ERK/Src e Wnt9b nas fases iniciais do desenvolvimento epididimário na prole masculina de ratos Wistar. ....	95

<b>CONCLUSÕES</b> .....	106
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	108

*Resumo*

1 O ambiente desempenha papel crucial durante o desenvolvimento fetal, podendo influenciar  
2 diretamente a saúde da prole. Assim, o estado nutricional materno é essencial para a saúde e  
3 bem-estar do feto. Há relatos de alterações em parâmetros relacionados à função epididimária,  
4 em animais adultos, cujas mães sofreram restrição de proteína durante as fases de gestação e  
5 lactação. A origem das alterações funcionais no epidídimo pode estar relacionada à fatores  
6 hormonais, bem como na expressão de seus receptores, e por meio da modulação de moléculas  
7 de sinalização como FGFs (Fator de crescimento de Fibroblastos), vias da ERK e Wnt, e à  
8 funcionalidade da Src, ou seja, proteínas relacionadas aos processos do desenvolvimento  
9 epididimário. No entanto, não há informações que esclareçam as causas dessas alterações ou  
10 como a restrição proteica atua ao longo do desenvolvimento pré e pós-natal do epidídimo. Desta  
11 forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar o impacto da restrição proteica materna, no ducto  
12 mesonéfrico e no epidídimo nas fases iniciais do desenvolvimento. Assim, ratas *Wistar* prenhes  
13 foram divididas em dois grupos experimentais que receberam uma dieta de normoproteica (NP;  
14 17% de proteína; n=19) ou hipoproteica (HP; 6% de proteína; n=19) durante a gestação e a  
15 lactação. Cinco ratas prenhes de cada grupo foram eutanasiadas para coleta dos ductos  
16 mesonéfricos dos embriões no dia gestacional (DG)17,5 e as demais permaneceram até os dias  
17 pós-natais (DPN) 7 ou 14. Os filhotes machos tiveram seus parâmetros biométricos aferidos e,  
18 em seguida, foram eutanasiados. Procedeu-se a coleta de sangue para análise dos hormônios  
19 sexuais e dos órgãos genitais, os quais foram pesados e armazenados. Durante toda a fase de  
20 gestação e lactação parâmetros maternos, como consumo alimentar e peso corpóreo, também  
21 foram aferidos. O epidídimo foi processado segundo técnicas histológicas, imuno-  
22 histoquímicas e de Western blotting para detecção de AR, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , 5 $\alpha$ -red, P450aro, Wnt9b,  
23 Src Y416 e Y527, Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2), AQP1 e 9, FGFR1 e 2, VEGF, VEGFR,  
24 PCNA. As mães restritas tiveram seus parâmetros alimentares e corpóreos alterados pela dieta,  
25 assim como os filhotes machos, os quais nasceram menores e com redução da distância  
26 anogenital (DAG) e do peso dos órgãos genitais. Os ductos mesonéfricos do grupo HP tiveram  
27 comprimento menor nos tempos de 0h e 24h quando comparado ao grupo NP. No DPN7 houve  
28 aumento de estradiol sérico e dos níveis proteicos da ERK1/2, Src-426, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , P450 e  
29 VEGFa e diminuição de AR, 5 $\alpha$ -red, FGFR1, FGFR2, Src-527, AQP9 e VGFR2, e redução no  
30 diâmetro luminal e tubular na região proximal no grupo HP. No DPN14, houve redução dos  
31 níveis proteicos de AR, AQP9 e Wnt9b e aumento de ER $\alpha$ , P450aro e ERK2 nos animais  
32 restritos. Neste mesmo grupo, a altura do epitélio foi menor nas regiões do segmento inicial  
33 (SI) e corpo, e do diâmetro tubular no corpo. Além disso, o presente estudo foi o primeiro a  
34 realizar a imunolocalização da AQP1 no epidídimo de animais de 14 dias, bem como observar

35 diminuição da microdensidade vascular no grupo HP quando comparado ao NP. Concluimos  
36 que a restrição proteica materna altera a morfogênese epididimária durante o desenvolvimento  
37 pré e pós-natal. Essas alterações estão associadas ao suprimento sanguíneo prejudicado, a falhas  
38 nas vias hormonais e a alterações na expressão de proteínas necessárias para a angiogênese,  
39 formação e manutenção do microambiente epididimário, bem como em proteínas responsáveis  
40 pelo crescimento e diferenciação epididimário. Assim, nossos dados sugerem que essas  
41 alterações durante os estágios iniciais do desenvolvimento do epidídimo podem estar  
42 relacionadas a alterações na qualidade dos gametas, já observada em animais adultos.

*Abstract*

1 The environment plays a crucial role during fetal development and can directly influence the  
2 health of the offspring. Thus, maternal nutritional status is essential for fetus' health and well-  
3 being. There have been reports of alterations in parameters related to epididymal function in  
4 adult animals whose mothers suffered protein restriction during the gestation and lactation. The  
5 origin of the functional alterations in the epididymis can be related to the hormonal factors, as  
6 well as in the expression of its receptors, and on signaling molecules modulation like FGFs  
7 (Fibroblast Growth Factor), ERK and Wnt pathways, and functionality of Src, or proteins  
8 related to epididymal development. However, there is no information to clarify the causes of  
9 these changes or how protein restriction acts throughout pre and postnatal development. The  
10 aim of this study was to evaluate the impact of maternal protein restriction on the mesonephric  
11 duct and in the early stages of epididymal development. Pregnant female Wistar rats were  
12 divided into two groups that received either normoprotein (17%; NP) or low-protein (6%; LP)  
13 diet ad libitum during gestation and lactation. Five pregnant rats from each group were  
14 euthanized to collect the mesonephric ducts on gestational day (DG) 17.5 and the others rats  
15 remained until the postnatal days (PND) 7 or PND14. The male offspring had their biometric  
16 parameters verified and were euthanized. Blood was collected for sex hormones analysis and  
17 genital organs were weighted and stored. Throughout the gestation and lactation maternal  
18 parameters, such as food consumption and body weight, were also measured. The epididymis  
19 was processed according to histological, immunohistochemical and Western blotting  
20 techniques for AR, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , 5 $\alpha$ -RD, P450aro, Wnt9b, Src Y416 and Y527, Phospho-p44/42  
21 MAPK (ERK1/2), AQP1 and 9, FGFR1 and 2, VEGF, VEGFR and PCNA detection. Restricted  
22 mothers had their food consumption and body parameters altered by low-protein diet, as did  
23 the male offspring, which were born smaller and with anogenital distance (DAG) reduced. The  
24 HP mesonephric ducts lengths were shorter at 0h and 24h when compared to the NP group. At  
25 PND7 there was an increase in serum estradiol and in the ERK1 / 2, Src-426, ER $\alpha$ , ER $\beta$ , P450  
26 and VEGF $\alpha$  protein levels and a reduction in the AR, 5 $\alpha$ -red, FGFR1, FGFR2, Src-527, AQP9  
27 and VGFR2 expression. Besides a reduction in the luminal and tubular diameter in the HP  
28 epididymal proximal region. At PND14, there was a reduction of AR, AQP9 and Wnt9b protein  
29 levels and an increase of ER $\alpha$ , P450aro and ERK2 expression in the restricted animals. In this  
30 same group, the epithelium height was smaller in initial segment (SI) and caput, and in the  
31 corpus' tubular diameter. In addition, the present study was the first to perform the AQP1  
32 immunolocalization at 14-day-old animals epididymis, as well as, to observe a decrease in  
33 vascular microdensity in the HP group when compared to NP. We conclude that maternal  
34 protein restriction alters epididymal morphogenesis during pre and postnatal development.

35 These changes are associated with blood supply impairment and changes in hormonal pathways  
36 and proteins expression of those that are required for angiogenesis, formation and maintenance  
37 of the epididymal microenvironment, as well as proteins responsible for epididymal growth and  
38 differentiation. Thus, our data suggest that these changes during the early stages of epididymal  
39 development may be related to changes in spermatozoa quality already observed in adult  
40 animals.



# *Introdução*

## Aspectos Gerais da Desnutrição Materna e o Desenvolvimento Fetal

O desenvolvimento embrionário e fetal dos mamíferos envolve eventos sequenciais altamente controlados e precisos. Esses eventos são amplamente regulados por meio de diferentes mecanismos e sinalizações moleculares do próprio embrião e, também podem estar relacionados com as interações do embrião com o ambiente materno. Assim, o ambiente materno precisa se adequar à gestação e este processo é determinado pela fisiologia materna e pelo genótipo materno e fetal (Grissom e Bowman, 2014).

As interações entre fatores intrínsecos materno-fetal, como genética e epigenética e fatores maternos extrínsecos, como a exposição a estressores graves, p.e. agentes tóxicos ou infecciosos e a nutrição materna, influenciam os processos de desenvolvimento. Porém, quando esses processos não são orquestrados de maneira correta e/ou eficiente, podem levar a anormalidades ou desvantagens durante o desenvolvimento de uma nova vida (Bateson *et al.*, 2004; Indrio *et al.*, 2017).

Está bem descrito na literatura que a má nutrição materna, seja a desnutrição ou supernutrição, é um dos fatores ambientais mais importantes que modifica o ambiente intrauterino (Skinner *et al.*, 2010). A desnutrição é caracterizada pelo desequilíbrio entre o fornecimento de nutrientes e a demanda corporal responsável por assegurar o bom funcionamento do organismo (Antiwi, 2008).

Durante o desenvolvimento, o embrião/feto depende totalmente da mãe para que as suas necessidades nutricionais sejam supridas, e caso não haja uma alimentação materna equilibrada em seus nutrientes, como proteínas, por exemplo, o indivíduo em formação pode desenvolver desnutrição precoce (Antiwi, 2008). A desnutrição precoce pode não somente refletir em baixo peso ao nascimento, mas sim, no desenvolvimento anormal do embrião/feto levando a mudanças na expressão de genes e conseqüentemente, alterando permanentemente a formação do indivíduo. Assim, afetará a morfologia dos tecidos e o funcionamento dos órgãos e sistemas, bem como, poderá comprometer a longevidade do ser humano ou animal (Drake & Walker, 2004; Chmurzynska, 2010; Bale *et al.*, 2010; Qasem *et al.*, 2012).

## 34 **Origem do Desenvolvimento da Saúde e de Doenças e a Restrição Proteica**

35 santosA hipótese de “Origem da Saúde e de Doenças durante o Desenvolvimento  
36 (DOHaD)”, amplamente aceita nas últimas décadas, é baseada na interação entre a  
37 plasticidade do desenvolvimento embrionário, os fatores ambientais maternos e o  
38 resultado da saúde e da doença do indivíduo quando jovem ou adulto (Bateson *et al.*,  
39 2004; Barker, 2007).

40 Conhecida também como programação fetal, estabelece que: as respostas do  
41 organismo em desenvolvimento frente a fatores estressantes ou ambientais não favoráveis,  
42 como a desnutrição materna, durante o período intrauterino e/ou perinatal, são  
43 “memorizadas” pelo embrião/feto, alterando a formação e funcionamento dos órgãos de  
44 maneira irreversível e podendo levar a doenças como câncer na idade adulta (Barker *et*  
45 *al.*, 1989; Langley-Evans e McMullen, 2010, Santos, 2018).

46 Nos anos 80, estudos epidemiológicos na Inglaterra e no País de Gales  
47 demonstraram uma associação entre baixo peso ao nascer e doenças cardiovasculares  
48 como hipertensão, infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral na idade adulta, e  
49 assim a hipótese de “origem fetal da doença” proposta por Barker foi apresentada (Barker,  
50 1989). A hipótese foi confirmada por estudos epidemiológicos também em outros países,  
51 os quais demonstraram que o feto pode ser programado para outras doenças crônicas que  
52 não cardiovasculares, como p.e., a diabetes mellitus tipo 2 ou síndrome metabólica.  
53 Assim, durante os anos subsequentes, pesquisas intensivas neste campo, tanto  
54 epidemiológicas quanto experimentais, ampliaram essa perspectiva (Gluckman e Hanson,  
55 2004).

56 Barker e colaboradores (2002) observaram que a má qualidade da nutrição,  
57 durante os períodos pré e pós-natal, desempenha um fator chave no desenvolvimento de  
58 vários tipos de doenças. Dentre os diversos trabalhos publicados, um estudo recente  
59 mostrou que adultos cujas mães eram obesas e/ou tinham diabetes gestacional adquiriram  
60 a pré-disposição a doenças metabólicas e cardiovasculares, devido a alterações no  
61 epigenoma durante a fase embrionária (Agarwal *et al.*, 2018).

62 A epigenética define uma variedade de processos que levam a mudanças  
63 hereditárias na expressão gênica sem alterar o sequenciamento do DNA, e ocorre com  
64 frequência durante os estágios iniciais de desenvolvimento (Egger *et al.*, 2004). Como o  
65 genoma é evolutivamente e quimicamente estável, os fatores nutricionais, geralmente, não  
66 causam alterações genômicas nas sequências de DNA. Mas, causam mudanças

67 hereditárias por meio de manipulação independente da sequência de DNA (Skinner *et al.*,  
68 2010). Assim, a má nutrição materna, durante a gestação, pode alterar os padrões de  
69 modificação epigenética, e conseqüentemente, o embrião/feto gera um fenótipo adaptado  
70 as condições intrauterinas no qual ele foi gerado. Estas alterações podem ser decorrentes  
71 da metilação no DNA, acetilação de histonas, *imprinting* hormonal e/ou alteração de  
72 fatores de transcrição e crescimento (Fowden e Forhead, 2009; Lee, 2015).

73 Dependendo das condições do ambiente materno, o embrião/feto pode  
74 desenvolver alterações endócrinas e metabólicas momentâneas. Algumas dessas  
75 mudanças são adaptativas e podem ter efeito imediato, fazendo parte da estratégia de  
76 sobrevivência a uma condição intrauterina adversa pontual. No entanto, outras mudanças,  
77 sem benefícios imediatos, podem ser vistas como “respostas adaptativas preditivas”, no  
78 qual o organismo em formação tenta se preparar para condições pós-natais que também  
79 possam ser desfavoráveis (Maršál *et al.*, 2018).

80 Dentre os modelos conhecidos de programação fetal por nutrição materna, a  
81 restrição proteica na dieta oferecida a ratas gestantes e/ou lactantes é um dos modelos  
82 mais utilizados (Langley-Evans e McMullen, 2010; Fleming *et al.*, 2017). A literatura  
83 reporta que os impactos da restrição proteica materna, durante a gestação e/ou lactação,  
84 induz alterações morfofuncionais em diferentes órgãos nos filhotes, evidenciando o efeito  
85 generalizado (sistêmico) da má-nutrição materna (Brameld *et al.*, 1998).

86 Diferentes estudos com roedores observaram nos filhotes adultos, cuja as mães  
87 foram alimentadas com uma dieta hipoproteica durante a gestação e/ou lactação, diversas  
88 alterações como: menor quantidade de células beta e de ilhotas de Langerhans no pâncreas  
89 (Dahri *et al.*, 1991), proporção celular alterada entre os tipos celulares do fígado (Burns  
90 *et al.*, 1997), alterações no metabolismo lipídico (Sosa-Larios *et al.*, 2017), intolerância à  
91 glicose (Szlapiński *et al.*, 2019), redução no número de capilares do cérebro (Bennis-  
92 Taleb *et al.*, 1999), menor número de neurônios que controlam o apetite no hipotálamo  
93 (Plagemann *et al.*, 2001), alteração nos padrões de sono e ansiedade (Crossland *et al.*,  
94 2018), alterações na memória a curto prazo (Gould *et al.*, 2018), menor número de néfrons  
95 no rim (Habib *et al.*, 2011), redução na produção de colágeno na pele (Yamane *et al.*,  
96 2018), disfunção vascular e aumento da pressão arterial sistólica (Brawley *et al.*, 2003) e  
97 menor número de ovócitos nas fêmeas (Winship *et al.*, 2018).

98

99

## 100 **Restrição Proteica Materna e o Sistema Genital Masculino**

101 Apesar do número crescente de estudos mostrando os diversos efeitos da  
102 programação fetal gestacional por restrição proteica sobre diferentes órgãos, aspectos  
103 reprodutivos, sobretudo os masculinos, são ainda relativamente escassos em comparação  
104 àqueles que abordam aspectos da síndrome metabólica ou em outros sistemas. Além do  
105 mais, os mecanismos que levam a estas alterações celulares e moleculares também ainda  
106 estão longe de ser totalmente conhecidos (Zambrano *et al.*, 2005).

107 Dados da literatura indicam que este modelo experimental provoca alterações na  
108 prole masculina de mães subnutridas durante a gestação. Dentre essas alterações  
109 destacam-se: redução da distância anogenital (Rinaldi *et al.*, 2013; Santos *et al.*, 2018),  
110 alteração na concentração sérica de testosterona, estradiol e di-hidrotestosterona (DHT)  
111 (Zambrano *et al.*, 2005; Teixeira *et al.*, 2007; Rinaldi *et al.*, 2013, Santos *et al.*, 2018),  
112 atraso no desenvolvimento do epitélio germinativo e na diferenciação das células de  
113 Sertoli (Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2012) e atraso na instalação da puberdade em animais  
114 adultos (Zambrano *et al.*, 2005; Toledo *et al.*, 2011; Rodriguez-Gonzalez *et al.*, 2014).

115 A maioria dos artigos publicados mostrou alterações significativas na próstata da  
116 prole de mães restritas ao consumo de proteína. Os autores observaram diversos efeitos  
117 deste modelo de programação fetal, em ratos jovens, adultos e idosos. Dentre os resultados  
118 obtidos, os principais foram: atraso na morfogênese (Pinho *et al.*, 2013, Colombelli *et al.*,  
119 2017), alterações na microdensidade vascular em ratos jovens (Colombelli *et al.*, 2017),  
120 alteração na expressão de receptores hormonais em ratos jovens (Ibrahim *et al.*, 2014),  
121 menor quantidade e tamanho dos ácinos na próstata dorsolateral (Ramos *et al.*, 2010) e  
122 ventral em ratos adultos (Rinaldi *et al.*, 2013; Colombelli *et al.*, 2017) e carcinogênese  
123 prostática em ratos idosos (Santos *et al.*, 2018). Grande parte dos estudos relacionados ao  
124 sistema genital masculino utilizam a próstata como órgão alvo, tendo em vista sua  
125 suscetibilidade a desenvolver câncer. Apesar disso, outros aspectos reprodutivos devem  
126 ser investigados, como, os fatores que estão relacionados ao sucesso reprodutivo.

127 Desde 1992, a infertilidade é considerada caso de saúde pública pela Organização  
128 Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 1992). Esta doença acomete mundialmente cerca de um  
129 em cada seis casais em idade reprodutiva que desejam ter filhos, ou seja,  
130 aproximadamente 15% dos casais sofrem de subfertilidade involuntária, sendo o fator  
131 masculino responsável por 30-50% dos casos (Boivin *et al.*, 2007; Miyamoto *et al.*, 2017).

132 A infertilidade masculina geralmente é causada por condições que afetam a  
133 produção e/ou função dos espermatozoides, ou falhas na ejaculação que podem ser  
134 decorrentes de doenças inflamatórias pélvicas ou infecções sexualmente transmissíveis  
135 (Kamel, 2010; Miyamoto *et al.*, 2017). No entanto, na última década, estudos tem  
136 relacionado a infertilidade masculina a defeitos congênitos ocasionados por falhas  
137 durante o desenvolvimento embrionário e fetal (Esteves *et al.*, 2011).

138 Estudos epidemiológicos e experimentais relacionados a aspectos reprodutivos  
139 em humanos, sobretudo os masculinos, mostraram que o baixo peso ao nascimento pode  
140 estar associado a subfertilidade masculina (Faure *et al.*, 2015). Boeri e colaboradores  
141 (2016) observaram uma associação entre a infertilidade ou baixa fertilidade com o baixo  
142 peso ao nascimento. Os homens analisados apresentaram alterações associadas,  
143 principalmente, às funções do epidídimo, como motilidade espermática reduzida,  
144 incluindo astenozoospermia (redução ou ausência da mobilidade dos espermatozoides) e  
145 maiores taxas de teratozoospermia (alterações na morfologia espermática que podem  
146 levar a infertilidade). Outros estudos utilizando animais experimentais, cujas mães foram  
147 submetidas à restrição proteica gestacional, além de nascerem com baixo peso, mostraram  
148 alterações na organização dos túbulos seminíferos nos testículos (Rodriguez-Gonzalez *et*  
149 *al.*, 2014) e também alterações associadas às funções do epidídimo, semelhantes às  
150 encontradas em homens com baixo peso ao nascimento, como: redução da motilidade,  
151 viabilidade e concentração espermática, alterações morfológicas e a presença de gota  
152 citoplasmática (Toledo *et al.*, 2011).

153 Nos últimos anos, a preocupação com o declínio na saúde reprodutiva vem  
154 crescendo, acompanhada por aumento na demanda de tratamentos para a infertilidade. No  
155 entanto, mesmo que esses tratamentos permitam que homens inférteis possam procriar,  
156 não se exclui a possibilidade de o problema permanecer e afetar a próxima geração (Wu  
157 *et al.* 2010). Entretanto, apesar dos estudos mostrarem efeitos da desnutrição materna,  
158 sobretudo da restrição proteica materna, associados a funções epididimárias, não há  
159 trabalhos na literatura que mostrem alterações diretas ou mecanismos que possam afetar  
160 o desenvolvimento do epidídimo, durante a vida perinatal da prole, e que possam estar  
161 ligados a funcionalidade deste órgão na idade adulta.

162

163

164

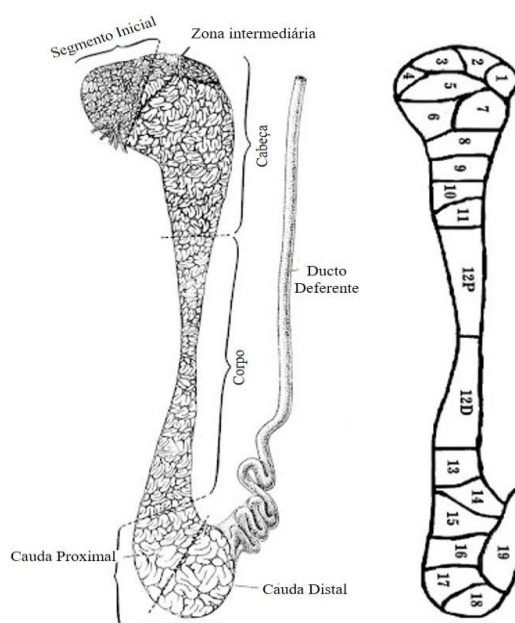
165

166            **Epidídimo**

167            O epidídimo, órgão par pertencente ao sistema genital masculino, é formado por  
 168 um ducto único altamente enovelado, cuja função primária é transportar os  
 169 espermatozoides que chegam dos testículos via ductulos eferentes, até os ductos  
 170 deferentes. Durante a passagem pelo epidídimo, os gametas interagem com o epitélio  
 171 epididimário especializado e fatores luminais. Esta interação promove os processos de  
 172 maturação, proteção e concentração espermática, por meio de transformações  
 173 bioquímicas, morfológicas e fisiológicas, e, por fim, ocorre a estocagem dos gametas  
 174 (Cosentino e Cockett, 1989; Hermo e Robaire, 2002, Gatti *et al.*, 2004).

175            Ao final da sua morfogênese, o ducto epididimário atinge mais de um metro de  
 176 comprimento no camundongo, três metros no rato e seis metros no humano. Este ducto  
 177 dobra-se em uma estrutura altamente organizada, a qual é composta por vários segmentos,  
 178 com morfologias e funções específicas (Joseph *et al.*, 2009). Assim, o processo de  
 179 maturação do espermatozoide depende de seu trajeto ao longo de todos os segmentos do  
 180 epidídimo, o qual, provavelmente sem o comprimento apropriado, não ocorreria a  
 181 maturação dos gametas de forma adequada (Hinton *et al.*, 2011).

182            Anatomicamente, o epidídimo é dividido em cabeça, corpo e cauda, mas devido a  
 183 importantes diferenças histológicas, bioquímicas e funcionais segmentares, presentes em  
 184 diferentes mamíferos, foram descritas quatro regiões bem definidas. Assim, o ducto  
 185 epididimário é compreendido em segmento inicial (SI), cabeça, corpo e cauda (Figura 1)  
 186 (Robaire e Hermo, 1988; Domeniconi *et al.*, 2016).



188 **Figura 1:** Comparação das regiões do epidídimo com os segmentos do epidídimo no rato  
189 adulto. Os segmentos 1 a 4 correspondem ao segmento inicial, a zona intermediária (ZI), os  
190 segmentos 5 a 11 correspondem à região da cabeça, os segmentos 12, 13 e 14 correspondem à  
191 região do corpo, e os segmentos 14 a 19 correspondem à região da cauda. diagrama adaptado de  
192 Domeniconi *et al.* 2016.

193

194 Todos os segmentos do epidídimo são importantes, pois são responsáveis por  
195 funções específicas. Por exemplo, as regiões proximais (SI e cabeça) são responsáveis  
196 pela a maturação espermática, enquanto a cauda mantém os espermatozoides em estado  
197 quiescente e desempenha papel no armazenamento dos gametas. Isto só é possível porque  
198 cada compartimento possui perfis distintos de expressão gênica que levam a expressão de  
199 moléculas de sinalização, proteínas reguladoras, transportadores e receptores específicos,  
200 os quais contribuem para a formação de um microambiente adequado em cada região.  
201 Assim, permite que o epitélio de cada segmento possa responder exclusivamente a  
202 diferentes estímulos, tais como hormônios e fatores de regulação (Cornwall, 2009;  
203 Bedford, 2015).

204 O epidídimo é um órgão tubular epitelial formado por um epitélio  
205 pseudoestratificado composto por diferentes tipos celulares: as células principais, basais,  
206 claras, estreitas, apicais, halo e dendríticas (Fig. 2). As células principais, estreitas, claras  
207 e basais, aderidas com múltiplas junções, delimitam o compartimento intraluminal,  
208 formando a barreira hemato-epididimária responsável pela imunoproteção do ambiente  
209 intraluminal (Cyr, 2011; Breton *et al.*, 2016).

210 As células principais constituem 80% do epitélio epididimário e são responsáveis  
211 pela maior parte das proteínas que são secretadas no lúmen. A contribuição destas células  
212 para o estabelecimento de um ambiente luminal ácido é complexa e depende de diferentes  
213 mecanismos. Por exemplo: no SI, as células principais reabsorvem o bicarbonato,  
214 enquanto que na cauda, dependendo de sinais fisiológicos, elas têm a capacidade de  
215 secretar bicarbonato para a manutenção do pH intraluminal. Além disso, as células  
216 principais também contribuem para a regulação da secreção de prótons por meio de  
217 sinalização parácrina para as células claras (Breton *et al.*, 2019).

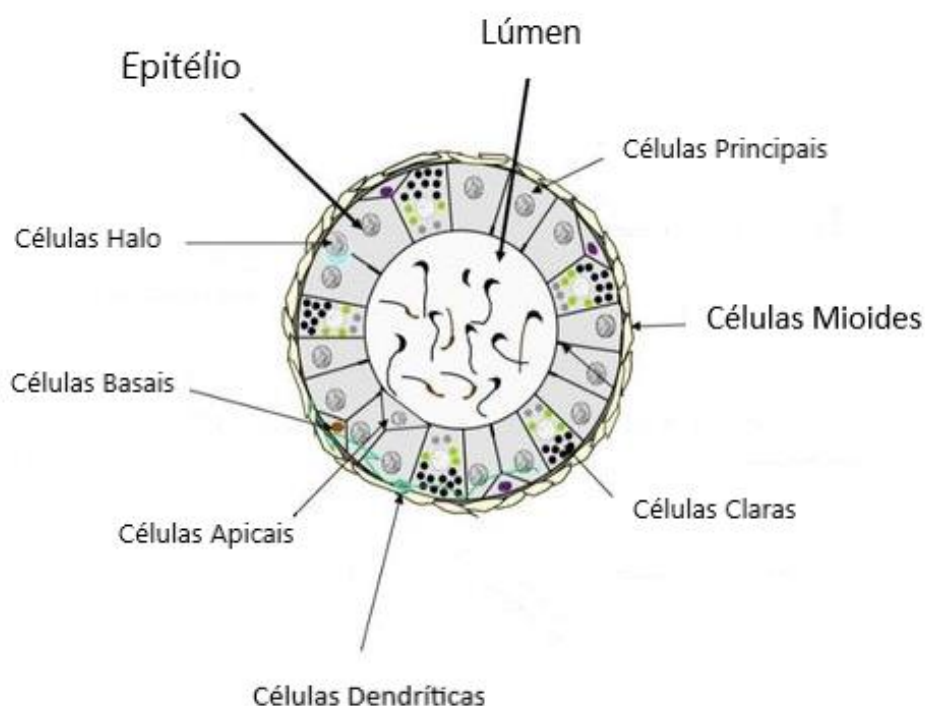
218 As células estreitas, presentes exclusivamente no SI, as células claras e as apicais  
219 são células epiteliais que apresentam atividade endocítica. Estas células contém a bomba  
220 vacuolar de prótons (V-ATPase) responsável pela acidificação intraluminal (Breton *et al.*,  
221 1996; Breton & Brown, 2013).



222 As células basais se encontram na base do epitélio, ao longo de todo o órgão, e  
 223 possuem um prolongamento citoplasmático, o qual permite a regulação destas células.  
 224 Dentre suas funções destacam-se a proteção do meio intraluminal do ducto contra  
 225 espécies reativas de oxigênio, e também a secreção de prostaglandinas. Além disso, estas  
 226 células apresentam características de células-tronco adultas, pois têm a capacidade de se  
 227 diferenciar *in vitro* e potencialmente regenerar o epitélio epididimário (Shum *et al.*, 2008;  
 228 Mandon *et al.*, 2015, Whitfield *et al.*, 2016; Sullivan e Belleannee, 2018). E por fim, as  
 229 células halo, que são as células imunes primárias do epidídimo (Sullivan *et al.*, 2019).

230 Os diferentes tipos celulares desempenham funções separadas e integradas. As  
 231 interações combinadas representam um processo complexo pelo qual o epitélio  
 232 epididimário estabelece e modula o ambiente apropriado para a maturação, proteção,  
 233 seleção e armazenamento dos gametas. Assim, as interações célula-célula podem afetar  
 234 diretamente o ambiente luminal e, conseqüentemente, a fertilidade do indivíduo (Breton  
 235 *et al.*, 2019).

236 O ducto epididimário, como outros órgãos tubulares, é envolvido por múltiplas  
 237 camadas concêntricas de células peritubulares ou mioides. Estas células são semelhantes  
 238 às células musculares lisas e tem como função contribuir para a aquisição da motilidade  
 239 dos espermatozoides ao longo do ducto (Oliveira *et al.*, 2016).



240

241 **Figura 2:** Diagrama esquemático da organização celular em uma seção representativa do  
 242 epidídimo de rato. Adaptado de Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 2015.

## 243 **Morfogênese Epididimária**

244 O epidídimo é um dos órgãos tubulares epiteliais menos estudados na perspectiva  
245 da morfogênese. Esclarecer e compreender os processos do desenvolvimento epididimário  
246 como alongamento, enovelamento, expansão e diferenciação, vem atraindo o interesse de  
247 pesquisadores da área de reprodução (Joseph *et al.*, 2009). A formação da estrutura tubular  
248 é seguida por eventos morfogênicos únicos em cada órgão para gerar sua estrutura adulta  
249 final. A morfogênese do epidídimo exhibe um padrão único, após sua formação, como um  
250 tubo simples, sistematicamente ele se alonga e se enrola, formando um tubo altamente  
251 enovelado em um pequeno espaço físico (Hinton *et al.*, 2011).

252 Para alcançar a forma, tamanho e comprimento ideal de um órgão tubular e,  
253 conseqüentemente, se tornar funcional é essencial que os complexos processos  
254 morfogênicos sejam regulados e que ocorram no tempo certo do desenvolvimento (Xu *et*  
255 *al.*, 2014). A morfogênese do epidídimo não é exceção. Trata-se da transformação de um  
256 ducto para um órgão segmentado, altamente enovelado e que deve permanecer com  
257 comprimento e forma adequados, de modo que possa ser funcional (Xu *et al.*, 2014).

258 Os estudos que abordam a morfogênese epididimária ainda são escassos. Mas,  
259 estudos sobre a formação do rim têm contribuído para a compreensão dos processos  
260 envolvidos na organogênese do epidídimo, uma vez que ambos os órgãos tem a mesma  
261 origem embrionária (Joseph *et al.*, 2009).

262 Durante a embriogênese, para que ocorra a formação e o desenvolvimento do  
263 epidídimo ocorrem três processos importantes, sendo que cada processo é mediado por  
264 fatores hormonais e de crescimento. São estes: (1) formação do ducto mesonéfrico, (2) a  
265 estabilização do sistema ductal através da interação epitélio-mesênquima e (3)  
266 diferenciação pós-natal (Murashima *et al.*, 2015).

267 Durante o desenvolvimento embrionário, o mesoderme se divide em três regiões, o  
268 mesoderme paraxial, o mesoderme intermediário e o mesoderme lateral. Os mesonéfricos,  
269 dos quais derivam os ductos mesonéfricos e Müllerianos, são formados a partir do  
270 mesoderme intermediário. Ainda não é bem conhecido(s) o(s) mecanismo(s) pelo(s)  
271 qual(is) o ducto mesonéfrico tem início na extremidade rostral do embrião, se alonga e se  
272 une à cloaca. No entanto, estudos utilizando o embrião de galinha mostraram que, uma vez  
273 que a extremidade rostral do embrião recebe a sinalização de um gradiente de fatores de  
274 crescimento de fibroblastos 8 (FGF8) e suas vias de transdução de sinalização, as células  
275 migram em direção à cloaca (Atsuta e Takahashi, 2015). Contudo que as células sejam

276 mantidas cercadas por altas concentrações de FGFs, elas mantêm um fenótipo  
277 mesenquimal semelhante à migração. As células que são mais distais, e, portanto, não são  
278 mais influenciadas pelas altas concentrações de FGF8, passam por uma transição  
279 mesênquima-epitelial e formam um lúmen. A maneira pela qual as células sofrem  
280 especificação no início deste evento não é conhecida. Porém, sabe-se que vários fatores de  
281 transcrição também são necessários para a formação e manutenção de ductos mesonéfricos,  
282 incluindo Gata3, Lim1, Pax2, Wt-1, Six1, Emx2 e Foxc1/Foxd1 (Murashima *et al.*, 2015b;  
283 McMahon, 2016). Mutações de cada um desses genes resultam em vários graus de má  
284 formação dos ductos mesonéfricos, por exemplo, camundongos mutantes Gata3 não  
285 completam a migração celular para a cloaca (Grote *et al.*, 2006). Além de fatores de  
286 transcrição, o ectoderma superficial próximo ao mesonéfro também desempenha um papel  
287 durante a formação do ducto mesonéfrico (Obara-Ishihara *et al.*, 1999).

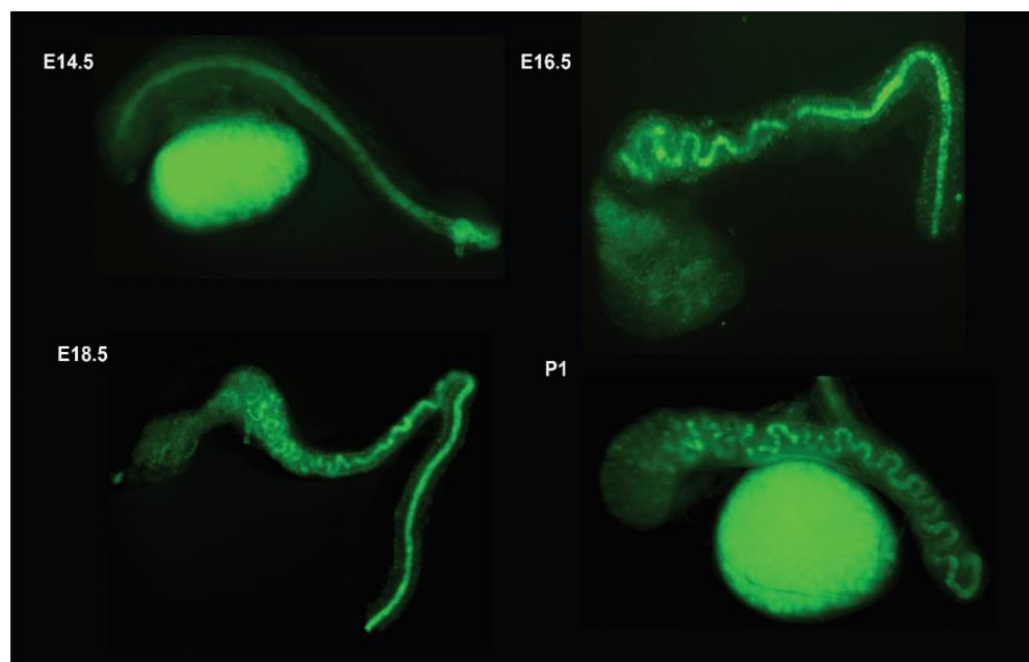
288 À medida que as células mesenquimais migram em direção à cloaca, elas induzem  
289 o mesênquima adjacente a formar túbulos epiteliais em forma de S ou J, os quais são  
290 chamados de túbulos mesonéfricos. Entretanto, muitos regredem e os poucos que  
291 permanecem, aqueles que se encontram mais cranialmente e são opostos aos testículos,  
292 formam os ductos eferentes (Sainio *et al.*, 1997).

293 O número e padronização dos ductos eferentes em humanos difere  
294 consideravelmente de outras espécies. Em roedores, por exemplo, a região proximal,  
295 incluindo o segmento inicial e cabeça, é formada apenas pelo ducto epididimário. Enquanto  
296 que no humano, a região de segmento inicial e parte da cabeça do epidídimo são formadas  
297 principalmente pelos ductos eferentes, e tem uma contribuição limitada do ducto  
298 epididimário. Portanto, é importante levar em consideração essas diferenças ao comparar  
299 as funções do epidídimo humano com o de outras espécies (Hinton e Avellar, 2018).

300 Estudar o desenvolvimento do epidídimo durante a fase embrionário em humanos,  
301 envolve uma série de fatores que geram dificuldades para tal. Assim, modelos animais, por  
302 exemplo, animais geneticamente modificados, são bons modelos experimentais utilizados  
303 em substituição ao humano. Esses modelos fornecem informações sobre os mecanismos  
304 dos processos que ocorrem durante a morfogênese epididimária, que são provavelmente  
305 semelhantes aos mecanismos que ocorrem no humano (Hinton e Avellar, 2018).

306 Em camundongos e ratos, o ducto mesonéfrico permanece reto até o dia  
307 embrionário 14,5 e E17,5, respectivamente. Então, na região mais proximal (suposta região  
308 de SI) observa-se um enovelamento bidimensional inicial. O enovelamento progride

309 gradualmente ao longo do ducto e no E18,5, em camundongos e E20,5 em ratos, inicia-se  
310 o enovelamento tridimensional (Fig. 3) (Joseph *et al.*, 2009; Hinton *et al.*, 2011).  
311



312

313 **Figura 3:** Processo de enovelamento do ducto epididimário de camundongos em diferentes  
314 estágios. Publicado por Hinton *et al.*, 2011. E= dia gestacional; P= dia pós-natal

315

316 Concomitantemente ao enovelamento, o processo de alongamento do ducto ocorre  
317 através de dois eventos principais: proliferação de células epiteliais e rearranjos destas  
318 células por meio da intercalação médio-lateral (Xu *et al.*, 2016). O enovelamento e o  
319 alongamento ainda continuam durante o período pós-natal, juntamente com a formação dos  
320 septos que permitem a divisão do ducto em vários segmentos. Embora existam diversos  
321 mediadores dos processos de alongamento e enovelamento, ainda não está claro como os  
322 mecanismos modulam o comprimento e a forma do ducto epididimário. No entanto, sabe-se  
323 que, se estes processos não ocorrerem de maneira adequada, o epidídimo não conseguirá  
324 desempenhar sua função e conseqüentemente, levará o indivíduo à infertilidade (Kumar e  
325 Tanwar, 2016).

326

327 A estabilização e diferenciação do ducto mesonéfrico é dependente de vários  
328 fatores, que incluem hormônios sexuais e fatores de crescimento. Os andrógenos  
produzidos pelos testículos fetais são responsáveis pela estabilização do ducto e,

329 posteriormente, essenciais para coordenar diferentes mecanismos durante a morfogênese  
330 epididimária (Welsh *et al.*, 2009).

331 Diferentemente de outros órgãos dependentes de andrógenos, tais como próstata e  
332 glândula seminal, tem sido sugerido que, para a estabilização do ducto mesonéfrico é  
333 necessária a chegada dos andrógenos, não só pela circulação sistêmica, mas também  
334 através do fluido seminal proveniente dos testículos (Shima *et al.*, 2013). Assim, em  
335 roedores, observou-se que a rede testicular se liga ao ducto eferente no E13,5, e tem início  
336 o transporte do fluido testicular (Tong *et al.*, 1996, de Mello Santos e Hinton, 2019).

337 Os andrógenos são hormônios esteroides que exercem seus efeitos através da  
338 ativação de seu receptor de andrógeno (AR), membro da superfamília de receptores  
339 hormônio-esteróide ativado por ligante. O AR pode ser ativado tanto pela testosterona,  
340 como pela di-hidrotestosterona (DHT), potente metabólito resultante da conversão da  
341 testosterona pela 5-alfa-redutase (Gloyne e Wilson, 1969; Cohen *et al.*, 1981; Shaw e  
342 Renfree, 2014).

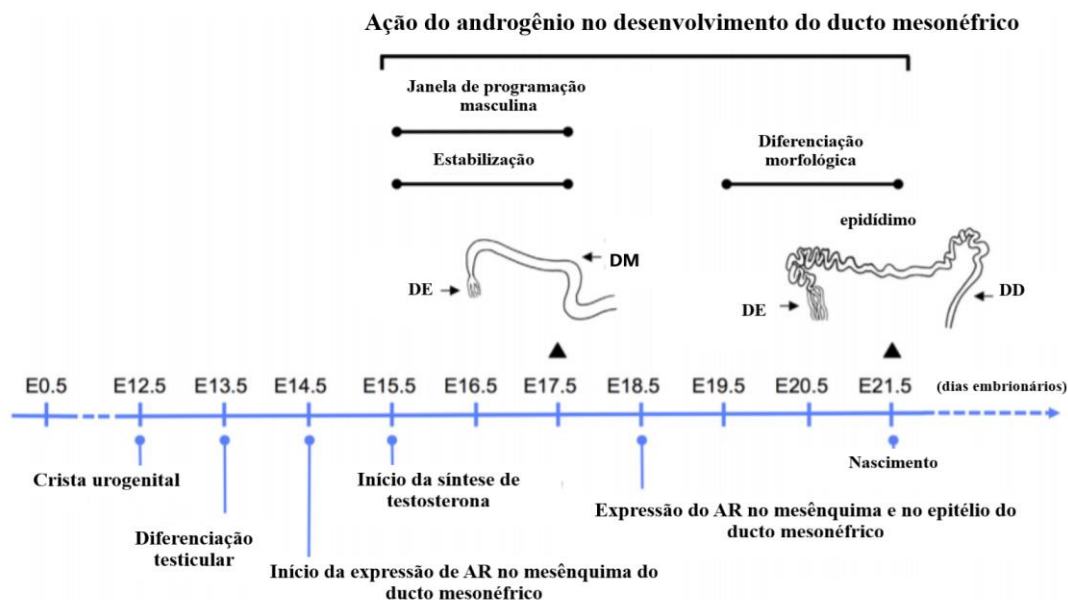
343 A testosterona, mas não a DHT, é responsável por orquestrar o desenvolvimento do  
344 ducto mesonéfrico. Pacientes com deficiência de 5-alfa-redutase mostraram ter o  
345 desenvolvimento epididimário pré-natal normal, e de fato, a DHT não está presente no  
346 ducto até o nascimento do indivíduo (Fig. 4).

347 O AR age como um fator de transcrição o qual regula a expressão de genes alvo  
348 específicos (sinalização androgênica genômica clássica), desempenhando um papel  
349 importante no desenvolvimento do ducto mesonéfrico. Durante o período embrionário, o  
350 AR é expresso pelas células mesenquimais, e está ligado aos processos de  
351 proliferação/alongamento celular e enovelamento, por meio da modulação de fatores de  
352 crescimento, incluindo inibina betaA (Inba), Wnt5a, Fgf8, Dusp6, Hoxa10, entre outros  
353 (Murashima *et al.*, 2015).

354 Murashima e colaboradores (2011), avaliando tecidos nocaute específicos para AR,  
355 demonstraram que a estabilização do ducto mesonéfrico, o alongamento e a indução do seu  
356 enovelamento, não ocorrem na ausência de AR, demonstrando a importância deste receptor  
357 no mesênquima. Portanto, a exposição pré-natal a compostos que reduzem a síntese ou a  
358 ação da testosterona podem interferir no desenvolvimento epididimário frequentemente  
359 resultando na disgênese ou agenesia do órgão.

360

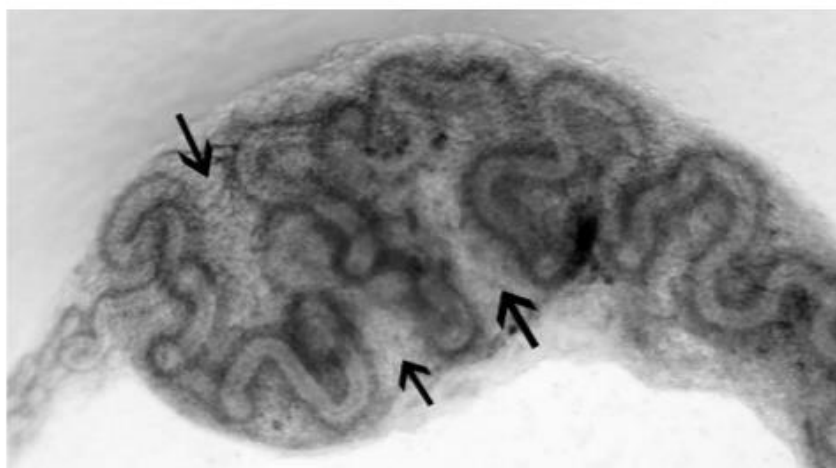
361



362 **Figura 4:** Diagrama esquemático representando eventos chaves da ação dos andrógenos  
 363 no desenvolvimento do ducto mesonéfrico no embrião de ratos Wistar. DM= ductos mesonéfricos;  
 364 DE= ductos eferentes; DD= ductos deferentes. Adaptado de Hinton e Avelar, 2018.  
 365

366 Hinton e colaboradores (2011) observaram que na região onde o *looping* ou  
 367 dobramento ocorrem, há remodelação assimétrica extracelular considerável, tornando-se  
 368 evidente que para que ocorra o envelhecimento do epitélio é necessária interação entre  
 369 epitélio e mesênquima. Assim, ficou evidente que o mesênquima circundante ao epitélio  
 370 apresenta papel fundamental para o envelhecimento do ducto.

371 Como pode ser observado na Figura 5, o mesênquima circundante (setas) ao epitélio  
 372 epididimário em desenvolvimento, influencia no envelhecimento do ducto. Ou seja, as  
 373 limitações de espaço conforme estabelecido pelas fronteiras do mesênquima circundante,  
 374 desempenham papel fundamental no início do envelhecimento 3D (Hinton *et al.*, 2011).



375

376

377

378

379

380

**Figura 5:** Padrão de enovelamento do ducto mesonéfrico nas regiões do segmento inicial e cabeça no DG18.5 em camundongos. As setas apontam para a movimentação das células mesenquimais que tem influência sobre a formação das dobras epiteliais. Publicado por Hinton *et al.*, 2011.

381

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

Além da testosterona, alguns fatores de crescimento também regulam a expressão gênica e as interações epitélio-mesenquimal no epidídimo. O fator de crescimento de fibroblastos (FGF) atua em eventos de sinalização durante a formação do ducto mesonéfrico e no desenvolvimento epididimário pós-natal. Diferentes tipos de FGF se ligam e ativam cascatas intracelulares através de quatro receptores tirosina-quinase de FGF (FGFR 1-4). No mesênquima, ocorre a expressão do FGFR1 e no epitélio do FGFR2, tendo como função principal regular a proliferação celular durante a fase pré-natal e atuar na promoção da citodiferenciação na fase pós-natal (Kitagaki *et al.*, 2011; Ornitz e Itoh, 2001). Cabe ressaltar que os FGFs são modulados por fatores androgênicos, porém os mecanismos moleculares dessa interação ainda não conhecidos (Donjacour *et al.*, 2003; Murashima *et al.*, 2015).

392

393

394

395

396

397

Outras proteínas, como as Wnts, também estão relacionadas com processos que ocorrem durante o desenvolvimento, incluindo a proliferação e a polaridade celular. As Wnts são altamente expressas nos órgãos precursores dos genitais, como o ducto mesonéfrico e ducto de Müller. A ausência de sinalização destas proteínas leva ao desenvolvimento incorreto dos órgãos reprodutivos derivados desses precursores (Carroll *et al.*, 2005., Tanwar *et al.*, 2010).

398

399

Durante a morfogênese pré e pós-natal, o epidídimo expressa diversas Wnts. Dentre elas estão as Wnt4 e a Wnt9b, sendo que a Wnt9b é a mais expressa, atua com um sinal

400 parácrino e está relacionada aos primeiros sinais do desenvolvimento do ducto mesonéfrico  
401 (Carroll *et al.*, 2005).

402 Nos mamíferos, em geral, o desenvolvimento pós-natal do epidídimo pode ser  
403 dividido em três períodos que ocorrem em duas fases: primeira fase – período  
404 indiferenciado; segunda fase – período de diferenciação e expansão (Hinton *et al.*, 2011).  
405 A primeira fase em roedores tem início no DPN1 e segue até DPN7. Nos primeiros dias  
406 após o nascimento inicia-se a segmentação anatômica do epidídimo. O epitélio é ainda  
407 indiferenciado e é caracterizado por células colunares. A diferenciação celular terá início  
408 somente com o aparecimento de células halo após o DPN7 (Robaire *et al.*, 2006).

409 A segunda fase se inicia no DPN7 e termina próximo ao DPN44-50. O epitélio do  
410 epidídimo se diferencia então, nas seguintes células: basal, apical, principais e células  
411 claras. Mas somente no início da puberdade, próximo ao DPN44, é que ocorre a completa  
412 diferenciação celular e a expansão do epidídimo. Este período de expansão descreve o  
413 crescimento contínuo do epidídimo e o aparecimento de espermatozoides no lúmen (De  
414 Miguel *et al.*, 1998; Dacheux *et al.*, 2005; Cornwall, 2009; Robaire *et al.*, 2006).

415 Na primeira fase, as células epiteliais e mesenquimais do epidídimo tem altos  
416 índices de proliferação, principalmente na região proximal. No seguimento inicial, a  
417 proliferação celular é regulada via proteínas quinases reguladas por sinal extracelular  
418 (ERK1/2). ERK1 e ERK2 são proteína-serina/treonina quinases que participam da cascata  
419 de transdução do sinal Ras-Raf-MEK-ERK. Esta cascata participa na regulação diversos  
420 processos, a ERK1 sendo mais responsiva na sobrevivência celular, transcrição, adesão  
421 celular e progressão do ciclo celular; e a ERK2 na migração celular, citodiferenciação,  
422 remodelação do citoesqueleto e metabolismo (Roskoski, 2012).

423 A ERK1/2 pode ser ativada via fosforilação de diferentes substratos, incluindo  
424 fatores de transcrição, proteínas quinases e outras proteínas funcionais. A ativação de Src,  
425 proteínas quinases não receptoras, é um dos fatores que leva à estimulação da cascata de  
426 sinalização Raf-MEK-ERK e atua na proliferação e no crescimento celular (Roskoski,  
427 2012).

428 As proteínas Src desempenham papel chave na regulação da transdução de sinal por  
429 um conjunto diverso de receptores da superfície celular no contexto de múltiplos ambientes  
430 celulares (Parsons and Parsons, 2004). Recentemente tem se destacado o papel essencial  
431 das Src no desenvolvimento epididimário e também em alterações importantes  
432 relacionadas à capacidade de maturação dos espermatozoides (Krapf *et al.*, 2012).



433 Krapf e colaboradores (2012) mostraram que camundongos Src nocaute  
434 apresentaram alterações na estrutura do epidídimo e espermatozoides com motilidade  
435 reduzida e incapazes de fertilizar um ovócito *in vitro*. Baseado nos resultados desse estudo,  
436 os autores atribuíram papel essencial para Src no desenvolvimento epididimário e  
437 sugeriram que a Src também é responsável por importantes alterações na capacidade de  
438 maturação dos espermatozoides que ocorrem durante sua passagem pelo epidídimo (Krapf  
439 *et al.*, 2012).

440 Como mencionado anteriormente, o SI tem papel fundamental na maturação dos  
441 espermatozoides, e assim sua correta formação é fundamental (Xu *et al.*, 2014). O SI  
442 contém altos níveis de atividade dos componentes da via ERK1/2. Durante o  
443 desenvolvimento pré-púbere, a primeira onda de fluido luminal testicular entra no  
444 epidídimo e ativa os componentes da via de ERK no epitélio do SI. Assim a via ERK inicia  
445 a promoção da diferenciação do epitélio, atuando principalmente nas células principais e  
446 células basais (Xu *et al.*, 2014; 2010; Rodriguez *et al.*, 2002).

447 Em relação aos componentes da via ERK, existem dois níveis de atividades no  
448 epitélio do epidídimo: nível basal e nível elevado (Xu *et al.*, 2011). Xu e colaboradores  
449 (2010) observaram que o nível de atividade basal dos componentes da via ERK foi  
450 encontrado nas células epiteliais, em todas as regiões do epidídimo, antes do período de  
451 diferenciação celular. Se as atividades desta via forem interrompidas no epitélio do SI de  
452 ratos jovem, a proliferação e diferenciação celular deste segmento cessam. Fato este, que  
453 resulta em uma onda de apoptose no epitélio do SI dos ratos na fase adulta. Portanto, o  
454 nível elevado de atividade dos componentes da via ERK é essencial para a proliferação  
455 celular, diferenciação e para a sobrevivência do epitélio que constitui o epidídimo antes da  
456 fase de citodiferenciação (Xu *et al.*, 2010; 2011).

457 Na segunda fase do desenvolvimento pós-natal do epidídimo, fase em que as células  
458 epiteliais iniciam a diferenciação, as células principais são as primeiras células a se  
459 diferenciarem. Nestas células, a presença da Aquaporina 9 (AQP 9) na região apical é sinal  
460 que esta diferenciação já teve início (Pastor-Soler, 2001; Badran e Hermo, 2002;  
461 Domeniconi *et al.*, 2008; Hermo *et al.*, 2008).

462 Na região mesenquimal, as células mesenquimais adjacentes às epiteliais, se  
463 diferenciam em células musculares lisas. As células endoteliais dos canais vasculares, os  
464 quais estão presentes no mesênquima epididimário, também se diferencia e ambos os tipos  
465 celulares passam a expressar a Aquaporina 1 (AQP1) (Huang, 2006; Domeniconi *et al.*,  
466 2008; Teixeira *et al.*, 2012).

467 As aquaporinas (AQPs) são proteínas transmembranas que atuam como canais de  
468 água aumentando a permeabilidade da membrana celular. Até o momento, nove mRNAs  
469 codificantes para AQPs (Aqp1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 e 11) estão presentes no epidídimo, entre  
470 elas as AQP1 e AQP9 (Agré, 2004; Da Silva *et al.*, 2006; Domeniconi *et al.*, 2008;  
471 Schimming *et al.*, 2015). No epidídimo, a presença da AQP1 é importante para manter o  
472 equilíbrio de fluidos no tecido e a AQP9 é a principal AQP do epitélio epididimário, onde  
473 contribui para a permeabilidade da membrana apical à água e solutos neutros. A AQP9  
474 contém um local putativo de ligação esteroide e é afetada diretamente pelo equilíbrio  
475 estrogênio/androgênio. Por outro lado, a AQP1 parece não ser diretamente afetada pelos  
476 hormônios sexuais

477 Arrighi e colaboradores (2010) observaram que a expressão de AQP9, no epidídimo  
478 de ratos adultos, foi modificada pela subnutrição no início da vida desses animais. Filhotes  
479 cujas mães sofreram restrição alimentar, durante a gestação e lactação, apresentaram  
480 diminuição na marcação desta proteína nas microvilosidades das células principais. Estes  
481 resultados sugeriram que a diminuição ou ausência desta proteína prejudica as funções do  
482 epidídimo e, possivelmente, compromete a fertilidade destes animais na vida adulta.

483 Recentemente nosso grupo de pesquisa mostrou que a restrição proteica materna  
484 altera os padrões de expressão das AQP1 e AQP9 no epidídimo de ratos jovens e adultos  
485 afetando a dinâmica dos fluidos e a angiogênese em estágios importantes do  
486 desenvolvimento do epidídimo. A restrição proteica materna diminuiu a expressão das  
487 AQP1 e AQP9 no SI e cabeça do epidídimo dos filhotes com 21, 44 e 120 dias pós-natais.  
488 Além disso, houve redução da densidade microvascular nos DPNs 21 e 44, relacionada a  
489 queda na expressão do Fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e seu receptor  
490 (VEGFr-2), os quais são os principais reguladores da promoção da angiogênese e também  
491 estão associados a fertilidade masculina. Contudo, nos animais adultos a densidade  
492 microvascular do epidídimo parece ter sido reestabelecida (Cavariani *et al.*, 2019).

493 O modelo de restrição proteica materna é um dos modelos de restrição precoce do  
494 crescimento mais caracterizados e utilizados para observar alterações que a mudança  
495 nutricional gera no desenvolvimento, e as consequências sobre o sistema genital masculino  
496 da prole. Tendo em vista o importante papel do epidídimo para a fertilidade masculina, pois  
497 é durante a passagem pelo epidídimo que os espermatozoides adquirem motilidade e  
498 capacidade fértil, passa a ser essencial entender os mecanismos que regulam o seu  
499 desenvolvimento.

500           Foram observadas alterações em parâmetros relacionados à funcionalidade do  
501 epidídimo, bem como, alterações morfofuncionais deste órgão nas fases pré-pubere e  
502 adulta, em ratos que foram submetidos à restrição proteica durante a gestação e lactação.

503           No entanto, não há informações na literatura que mostrem se a restrição proteica,  
504 em fase inicial do desenvolvimento, pode afetar a morfogênese epididimária durante as  
505 fases embrionárias e iniciais do desenvolvimento pós-natal. Assim, sugere-se que a origem  
506 das alterações funcionais no epidídimo adulto, descritas anteriormente, possam estar  
507 relacionadas a falhas em vias que atuam desde as fases iniciais do desenvolvimento  
508 epididimário, refletindo nos processos de diferenciação e maturação na vida pós-natal, e  
509 consequentemente, na funcionalidade do órgão.

510           Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar se dieta materna com baixa  
511 quantidade de proteínas pode alterar a morfogênese epididimária nos filhotes machos em  
512 fases iniciais do desenvolvimento em ratos *Wistar*, e assim, contribuir com novos dados  
513 para a biologia da reprodução e esclarecer possíveis lacunas sobre a baixa fertilidade  
514 relacionada ao epidídimo após restrição proteica materna.

515

516

517

518

519

520

521

522

523

524

525

526

527

528

529

530

531

532

533

534

535

536

537

538

539

540

541

542

543

544

545

546

547 *“Os que se encantam com a prática sem a ciência são como os timoneiros que*  
548 *entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino”.*

549 *(Leonardo da Vinci)*

550

551

552

553

554

555

556

557

558

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

## *Capítulos*

570

571

572

573

574

575

576

577                   **Capítulo I** – Maternal Low-Protein Diet During Gestation and Lactation Causes  
578 Estrogenization and Lead to an Impairment in Epididymal Development in the Early  
579 Postnatal Development of Male Rat Offspring.

580

581                   Artigo a ser submetido na revista *The Journal of Nutritional Biochemistry*. Fator de impacto  
582 4,49

583

584                   **Capítulo II** – Maternal Protein Restriction Modulates Angiogenesis and AQP9  
585 Expression Leading to a Delay in Postnatal Epididymal Development in Rat.

586

587                   Artigo submetido a revista *Cells* (em fase de revisão). Fator de Impacto 5,65

588

589                   **Capítulo III** - Dieta Materna de Baixa Proteína modula ERK/Src e Wnt9b nas fases  
590 iniciais do desenvolvimento epididimário na prole masculina de ratos Wistar.

591

592                   Apresentação dos resultados e discussão preliminar

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

611

612

613

614

615

616

617

618

619

620

# *Capítulo I*

621 MATERNAL LOW-PROTEIN DIET DURING GESTATION AND LACTATION CAUSES  
622 ESTROGENIZATION AND LEAD TO AN IMPAIRMENT IN EPIDIDYMAL  
623 DEVELOPMENT IN THE EARLY POSTNATAL DEVELOPMENT OF MALE RAT  
624 OFFSPRING.

625

## 626 **AUTHORS**

627 Talita de Mello Santos<sup>1\*</sup>, Marilia Martins Cavariani<sup>1</sup>, Luiz Gustavo de Almeida Chuffa<sup>1</sup>, Barry  
628 T Hinton<sup>2</sup>, Wellerson Rodrigo Scarano<sup>3</sup>, Raquel Fantin Domeniconi<sup>1</sup>.

629

630 <sup>1</sup>Department of Anatomy, Institute of Biosciences, University Est. Paulista/UNESP, Botucatu,  
631 SP, Brazil;

632 <sup>2</sup>Department of Cell Biology, University of Virginia School of Medicine, Charlottesville, VA  
633 29908, USA

634 <sup>3</sup>Department of Morphology, Institute of Biosciences, University Est. Paulista/UNESP,  
635 Botucatu, SP, Brazil;

636 \*e-mail corresponding author: [talitamello.tms@gmail.com](mailto:talitamello.tms@gmail.com); [talita\\_mellosantos@yahoo.com.br](mailto:talita_mellosantos@yahoo.com.br)

637

## 638 **ABSTRACT**

639 During gestation and lactation some maternal conditions, such as nutrition deficiency,  
640 may affect the intrauterine homeostasis and change the development of the offspring, leading  
641 to short/long-term systems effects. Previous studies have shown that a low protein maternal  
642 diet can modify organ development and can alter spermatozoa quality in male rat offspring,  
643 impairing the fertility of these animals at adulthood. These alterations are associated mainly  
644 with epididymal function and could be a consequence of an abnormal epididymal development.  
645 The aim of this study was to investigate the effects of maternal protein restriction on the  
646 epididymal development of male offspring in Wistar rats. Pregnant female Wistar rats were  
647 divided into two groups that received either normoprotein (17%; NP) or low-protein (6%; LP)  
648 diet *ad libitum* during the perinatal phase. At postnatal days (PND) 1, 7 and 14 male pups were  
649 euthanized and blood was collected for testosterone and estradiol serum levels analyzes. At  
650 PND 7 and 14, the epididymides were collected to analyze protein expression of androgen



651 receptor (AR), estrogen receptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ), estrogen receptor- $\beta$  (ER- $\beta$ ), 5 $\alpha$ -reductase (5 $\alpha$ -red),  
652 P450-aromatase (P450aro), fibroblast growth factor 1 and 2 (FGFR1 and FGFR2). During  
653 gestation, no statistical difference was observed in maternal body weights between the groups.  
654 The male pups from the LP group, at all ages, showed a decrease in their body weights, body  
655 lengths, and anogenital distances (AGD). At PND7, estradiol increased in the LP group. At  
656 PND7 and PND14, AR, 5 $\alpha$ -red, and FGFR decreased in the LP animals, and the level of ER- $\alpha$   
657 and P450aro expression increased. Maternal protein restriction during gestational and  
658 lactational periods causes an estrogenization leading to an impairment in epididymal  
659 development in the early postnatal development of male offspring.

660

## 661 1. INTRODUCTION

662 Undernutrition during pregnancy is an important environmental factor which is known  
663 to cause intrauterine growth restriction. This factor is able to program different types of diseases  
664 in the offspring, which materialize after birth and into adulthood, including organ dysfunction  
665 and chronic diseases such as cardiac and metabolic disorders [1].

666 Low birth weight is used as a marker of intrauterine growth restriction and, in recent  
667 years, has also been associated with male subfertility[2,3]. The relationship between the  
668 developmental environment and postnatal reproductive function in men, suggests that early life  
669 events may contribute to male infertility, although the mechanisms by which this occurs are not  
670 yet elucidated [4].

671 Studies have shown that the maternal protein restriction (MPR) can directly or indirectly  
672 affect hormone release, hormone receptor expression/distribution, cellular function, and tissue  
673 organization, growth, differentiation, and maturation of the offspring. These effects of MPR  
674 lead to long-term consequences for reproductive function. Furthermore, MPR delays sexual  
675 maturation and alters male offspring reproductive function as alterations in pituitary function  
676 and GnRH sensitivity, decreased in Sertoli cell number, altered epididymal functions such as  
677 sperm motility and count, and increased numbers of sperm exhibiting morphological  
678 abnormalities in adulthood[5–9].

679 In the male embryos, the proximal region of the mesonephric tubules connects with the  
680 either mesonephric ducts or Wolffian ducts (WD) that will become the efferent ducts and the  
681 epididymis, respectively. The WD will elongate and coil, under the influence of testosterone  
682 and growth factors that regulate gene expression and epithelial-mesenchymal interactions[10].  
683 During embryonic development, the testosterone (T) is responsible for WD stabilization and

684 the induction of its elongation and coiling. T action is mediated by the androgen receptor (AR)  
685 that is expressed in the mesenchyme that surrounds the duct[11]. However, at epididymal  
686 postnatal development, the most active regulator of epididymal cell functions is 5 $\alpha$ -  
687 dihydrotestosterone (DHT), a potent metabolite resulting from the conversion of (T) through  
688 5 $\alpha$ -reductase (5 $\alpha$ R). DHT also plays the most active role in the development of the caput, which  
689 is also mediated by AR[12,13].

690 Another important hormone during the sex ducts' development is the estradiol (E2). E2  
691 is the result of T conversion by p450-aromatase (P450aro). Its action is mediated by estrogen  
692 receptors type  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ), and is involved in the mediation of growth and functional  
693 differentiation of the epithelial duct. The first evidence of ER expression, in the mouse, was  
694 observed in the initial segment (IS) of the epididymis on embryonic day 16, suggesting a role  
695 for estrogen during development[14–16]. It is inferred that the balance between androgen and  
696 estrogen plays a central role in male reproductive development[17].

697 In addition to hormones, growth factors also act as signaling molecules and are  
698 important regulators of pathways for epididymal development. Fibroblast growth factors  
699 (FGFs) and their receptors (FGFRs) constitute a complex system that controls many  
700 physiological processes, including cell growth, migration, and differentiation. FGFR1 is  
701 expressed in epididymal mesenchyme cells, and FGFR2 is expressed in epithelial cells. Both  
702 receptors modulate cell proliferation, beginning with WD formation and continuing through  
703 cell differentiation during postnatal epididymal development[20–22].

704 Despite the fact that malnutrition-related reproductive suppression in rats is a well-  
705 known fetal programming, we do not have previous knowledge on how a maternal low-protein  
706 diet affects the expression of P450aro, 5 $\alpha$ -red, steroid receptors and growth factors in  
707 epididymal tissues. It is also unknown how this programming affects the hormone balance of  
708 male rat offspring at early stages of postnatal development. The present study was designed to  
709 identify changes in these parameters that may appear early in postnatal development and that  
710 are related to reproductive damage in the adult animal whose mother was subjected to protein  
711 restriction during the gestation and lactation period.

712

## 713 **2. MATERIAL AND METHODS**

### 714 *2.1 Experimental Design*

715 Adult female (60 days of age,  $n = 40$ ) and male (90 days of age,  $n = 20$ ) Wistar rats were  
716 obtained from the Central Biotherium of São Paulo State University (UNESP) and housed in  
717 polypropylene cages (43 cm X 30 cm X 15 cm) with laboratory grade pine shavings as bedding.  
718 The rats were maintained under controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), relative humidity ( $55 \pm 10\%$ )  
719 and lighting conditions (12:12-h photoperiod). Balanced rat chow (NUVILAB® OUTRA  
720 MARCA CR1 – Nuvital-PR) and filtered tap water were provided ad libitum. The experimental  
721 protocol was designed following Brazilian laws and was approved by the Ethical Committee  
722 on Animal Use from the Institute of Biosciences of Botucatu (CEUA: protocol n° 797).

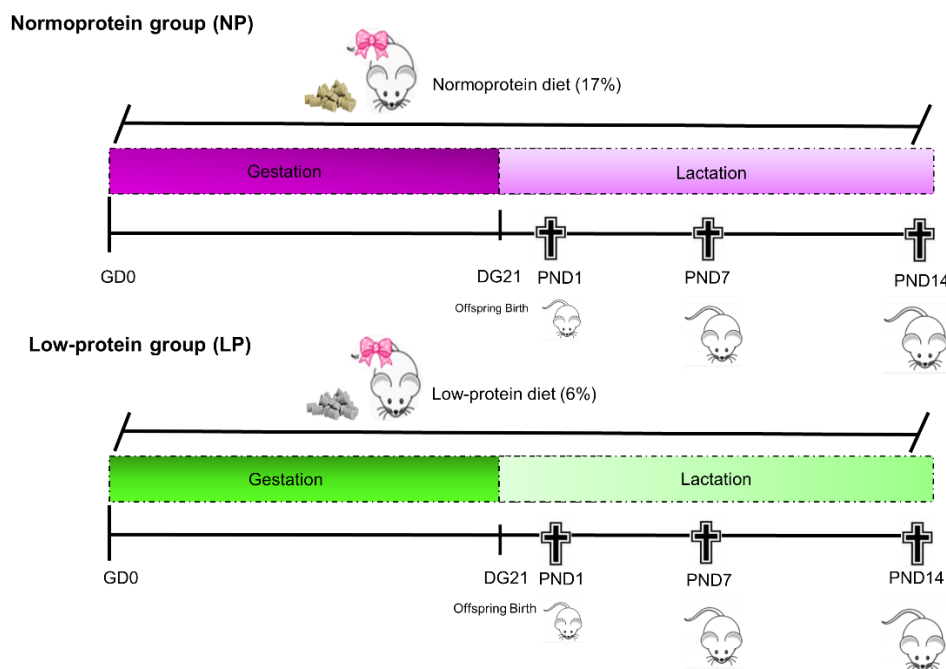
723 During the dark period of the light/dark cycle two female rats were mated with one  
724 male, and the following day, vaginal smears were performed. The day of detection of the sperm  
725 in the vaginal smear was considered gestational day 0 (GD 0). Pregnant females were randomly  
726 allocated into 2 experimental groups: the normoprotein group (NP,  $n=19$ ) and the low-protein  
727 group (LP,  $n= 19$ ). The NP pregnant females were fed a normoprotein diet (17% protein) ad  
728 libitum, and the LP pregnant females were fed a low-protein diet (6% protein) ad libitum. Both  
729 groups received the AIN-93G diet over the entire gestational and lactation periods. This diet  
730 was designed by the American Institute of Nutrition to accommodate the increased nutritional  
731 demands of rat growth as well as females who are pregnant or lactating.

732 The pregnant females were housed in individual cages and weighed every week to  
733 monitor weight gain. During the entire gestation period until PND14, the total food consumed  
734 was monitored weekly, and the values obtained were divided by seven to estimate the daily  
735 consumption of each animal in both groups.

736 After birth, the anogenital distance (AGD), body weight and body length were measured  
737 in all pups using a digital caliper (Digimess®), and the litter size was standardized to eight pups  
738 per mother in both experimental groups to ensure the equality of weaning to all offspring. The  
739 pups remained with the mothers in individual boxes until the moment of euthanasia at PND1  
740 (NP=19 pups/group; LP=22 pups/group, PND7 (NP=17 pups/group; LP=19 pups/group) or  
741 PND14 (NP=19 pups/group; LP=26 pups/group) and had their body weight, body length, and  
742 AGD measured before euthanasia (Fig. 1).

743 After the pups were anesthetized with ketamine and xylazine, they were killed by  
744 decapitation, and the epididymides were collected. After being weighed, the left epididymides  
745 were immediately packed in cryotubes, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . The right  
746 epididymides were collected, dissected, fixed in 10% buffered formalin (0.1 M phosphate  
747 buffer pH 7.3) for 24 h, washed in running water for 24h, then stored in 70% alcohol (Fig. 1).  
748 The epididymis, epididymal fat, left testicle, ventral prostate, seminal vesicle and liver of each

749 animal were collected, dissected and weighed. Subsequently, the relative weight of the organs  
 750 was calculated according to the following formula: Organ weight/Body weight X 100 (in g or  
 751 mg/100g body weight). On the day of weaning, the mothers were weighed and euthanized. The  
 752 visceral, uterine and retroperitoneal fat pads, right and left kidney and liver were weighed.  
 753



754

755 **Figure 1:** Illustration of the experimental design.

## 756 2. 2 Hormonal Analysis Serum

757 Blood, obtained from ruptured cervical vessels, was collected in dry preservative-free  
 758 vials for hormone measurements. The serum was obtained after centrifugation (3000 rpm, 20  
 759 min, at 4°C) and was frozen at -80°C until the analyses. Pools of serum samples were made at  
 760 PND1 (3-4 animals/pool - 8 pools/group), PND7 (3-4 animals/pool – 8 pools/group), PND14  
 761 (2-3 animals/pool – 8 pools/group) due to the small amount of blood per animal. Testosterone  
 762 and Estradiol (17β-oestradiol) serum levels were determined by electrochemiluminescence  
 763 (Beckman Coulter®). The minimum level detectable of unconjugated testosterone and estradiol  
 764 distinguishable from zero (Calibrator Access Unconjugated Estradiol Calibrator S0) at 95%  
 765 confidence level are 0.1 ng/mL (0.35 nmol/L) and 0.017 ng/mL (0.059 nmol / L), respectively.

## 766 2. 3 Western Blot at PND7 and PND14

767 Total epididymides were used to perform western blotting. Due to the small size and  
 768 weight of the epididymides, pools were used with 4-5 animals/pool for a total of 5 pooled  
 769 samples at PND7, and 2-3 animals/pool for a total of 5 pooled samples at PND14. The samples

770 were homogenized at 4°C in RIPA buffer (BioRad®, USA) with protease inhibitor (Sigma-  
 771 Aldrich®, USA) with a Tureaux-type homogenizer for 3 5-second cycles. The homogenate was  
 772 centrifuged at 15,000 rpm for 20 min at 4°C, and the supernatant was collected. The protein  
 773 quantification was performed as described by Bradford[23] in ELISA plates with 96 wells and  
 774 read in an ELISA reader (595 nm). Aliquots (70 µg protein) were treated with buffer solution  
 775 (Laemli Sample Buffer - BioRad®) and β-mercaptoethanol at 95°C for 5 min. Then, the  
 776 proteins were separated by SDS-PAGE (Mini-Protean, BioRad®). After electrophoresis,  
 777 proteins were transferred to a nitrocellulose membrane in a wet transfer system. Nonspecific  
 778 protein binding was blocked with 3% skim milk in TBST buffer for 1 h at room temperature.  
 779 The membranes were incubated overnight with primary antibodies diluted in TBST as listed in  
 780 (Table 1). Subsequently, the membranes were washed three times for 10 min each wash in  
 781 TBST, then incubated for 2h with the HRP secondary antibodies diluted in TBST as listed in  
 782 (Table 1). The membranes were then washed three times for 10 min each wash with TBST.  
 783 Immunoreactive components were visualized with a chemiluminescence kit (Amersham™  
 784 ELC Select™ Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare®, UK), and the optical  
 785 density of each band was measured by ImageJ® Windows® software, normalized to β-actin.  
 786 CONTROLE NEGATIVO  
 787

**Table 1** – Western blot antibodies

Antibodies	1°	2°
Androgen Receptor (AR)	1:1000 (Milipore)	1:2000 (Sigma)
Estrogen Receptor-α (ERα)	1:200 (Abcam)	1:2000 (Sigma)
Estrogen Receptor-β (ER- β)	1:300 (Milipore)	1:2000 (Sigma)
P450 aromatase (P450aro)	1:500 (Biorbyt)	1:2000 (Sigma)
5-α-reductase (5α-RD)	1:500 (Milipore)	1:2000 (Sigma)
FGFR1 (Flg H-76)	1:200 (Santa Cruz)	1:2000 (Sigma)
FGFR2 (Bek c-17)	1:200 (Santa Cruz)	1:2000 (Sigma)
β-actin	1:800 (Abcam)	1:6000 (Abcam)

788

## 789 2. 4 Immunohistochemistry at PND7 and PND14

790 Epididymal sections from the NP and LP animals (sections of 5 animals from different  
791 litters; n= 4 animals/group) were subjected to antigen retrieval in a humid environment (electric  
792 pot) at 100°C in Citrate buffer pH 6.0 for 50 min. After being washed in distilled water, the  
793 sections were subjected to the blocking of endogenous peroxidase (3% hydrogen peroxide in  
794 methanol) for 15 min. To block nonspecific binding, the slides were incubated with 3% skim  
795 milk in PBS for 1 h. Then, the sections were incubated overnight (at 4°C) with primary  
796 antibodies to anti-AR- Androgen receptor (06-608; concentration 1:150; EMD-Milipore  
797 Corp.®, Billerica, Ma, USA); anti-ER- $\alpha$ - Estrogen Receptor type  $\alpha$  (ab75635; concentration  
798 1:200, Abcam Inc.®, Cambridge, Ma, USA) which were diluted in 1% BSA. After incubation  
799 with the primary antibodies, the sections were washed in PBS and then incubated with anti-  
800 rabbit secondary HRP antibody (ab97051; concentration 1:200, Abcam Inc.®, Cambridge, Ma,  
801 USA) for 2h at room temperature. The reaction was visualized with DAB chromogen (3,3'-  
802 diaminobenzidine tetrahydrochloride; Sigma-Aldrich Co.®, St. Louis, Mo, USA) and  
803 counterstained with hematoxylin for 1 min. The slides were scanned using a 3D Hitech  
804 Panoramic MIDI and analyzed and photographed using the Panoramic Viewer program.

805

## 806 2. 5 Statistical analysis

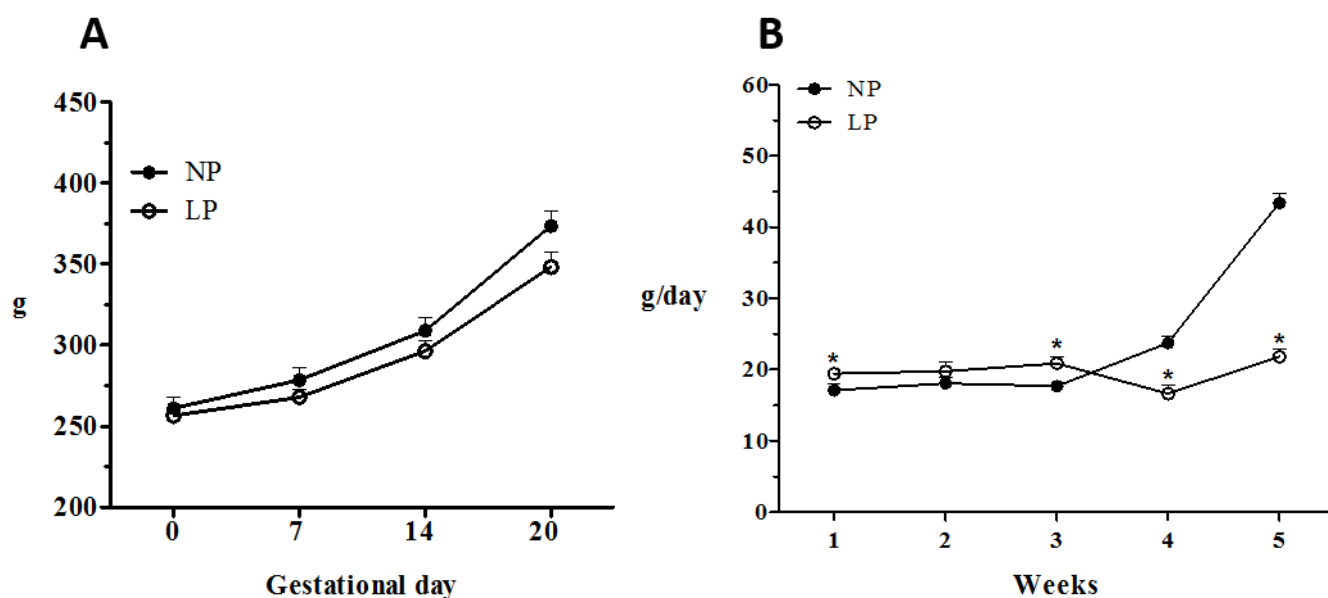
807 T-tests for parametric data and the Mann-Whitney test for nonparametric data were  
808 performed. The data were compared among experimental groups using GraphPad Prism®  
809 software (version 5.00). Differences were considered significant when  $p \leq 0.05$ . Data are  
810 presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM).

811

## 812 3. RESULTS

### 813 3.1 Maternal Parameters

814 Statistical differences were not observed in maternal body weights between the groups  
815 during pregnancy (Fig. 2A). However, regarding the intake of food, it was observed that at the  
816 gestation period the rats submitted to protein restriction increased the food intake. In contrast,  
817 at the lactation period (PND1 until PND21) a decrease of food intake was observed in the LP  
818 group when compared to the NP group (Fig. 2B).



819

820 **Figure 2:** Maternal body weight evolution during gestation (A) and daily maternal food consumption  
 821 per week (B) of Normoprotein (NP) and Low-protein (LP) females. Data expressed as Mean $\pm$ S.E.M. \*p  
 822 <0.05. Test t.n=19/group.

823 The mothers were weighed, euthanized, and then the visceral, uterine, and  
 824 retroperitoneal fat pads; right and left kidneys; and liver were collected and weighed (Table 2).

825

**Table 2** - Maternal body and organs weight at the end of lactation.

<i>Parameters</i>	<b>NP</b>	<b>LP</b>
Body weight (g)	305.60 $\pm$ 8.14	219.70 $\pm$ 4.82*
Visceral fat pad (g)	2.84 $\pm$ 0.18	2.24 $\pm$ 0.15*
Visceral fat pad (g/100g)	0.93 $\pm$ 0.05	0.97 $\pm$ 0.06
Uterine fat pad (g)	5.76 $\pm$ 0.44	4.61 $\pm$ 0.42
Uterine fat pad (g/100g)	1.86 $\pm$ 0.14	2.02 $\pm$ 0.17
Retroperitoneal fat pad (g)	2.29 $\pm$ 0.19	1.95 $\pm$ 0.18
Retroperitoneal fat pad (g/100g)	0.76 $\pm$ 0.07	0.84 $\pm$ 0.07
Kidney (R) (g)	1.00 $\pm$ 0.02	0.66 $\pm$ 0.01*
Kidney (R) (g/100g)	0.33 $\pm$ 0.01	0.30 $\pm$ 0.01*
Kidney (L) (g)	0.97 $\pm$ 0.03	0.63 $\pm$ 0.01*

Kidney (L) (g/100g)	0.31 ± 0.01	0.28 ± 0.01*
Liver (g)	16.36± 0.62	14.00± 0.40*
Liver (g/100g)	5.35 ± 0.16	6.44 ±0.23*

NP and LP. n=19/group. Data expressed as the mean ± S.E.M.. \* p <0.05. T-test

826 The body weight, visceral fat pad, kidney and liver weights of the LP mothers were  
827 lower when compared with the NP group. Thus, the decrease in maternal weight in the LP  
828 group agrees with the lower dietary intake observed in these animals during lactation.

829 It is important to observe that the difference in body weight between the two groups  
830 cannot be attributed to the difference in the accumulation of body fat. When we measured the  
831 weight of the maternal fat, we found that it was similar in both groups. Only the visceral fat  
832 presented statistical differences between NP and LP animals, but this difference disappeared  
833 when calculating the relative fat weight.

834

### 835 *3.2 Offspring Parameters*

836 The maternal protein deficiency reduced the body weights and the anogenital distances  
837 of both male and female pups. The body lengths were smaller in the LP male pups when  
838 compared with the NP groups (Table 3); however, there was no significant difference in the  
839 body lengths of female pups between the two groups (Table 3).

840

**Table 3** - Body weight and length; absolute and relative anogenital distance, and number of newborns PND1.

<i>Parameters</i>	<i>Male</i>		<i>Female</i>	
	<b>NP</b>	<b>LP</b>	<b>NP</b>	<b>LP</b>
Number of newborns	5.29 ± 0.43	5.47 ±0.52	5.71 ± 0.62	5.58 ±0.51
Body weight (g)	6.33 ±0.12	5.79±0.10*	5.87 ±0.09	5.79±0.10*
Body length (mm)	49.13 ± 0.32	47.46 ±0.21*	47.44 ± 0.38	46.48 ±0.30
Relative anogenital distance (mm/g <sup>3</sup> )	0.061 ± 0.001	0.055 ± 0.001*	0.022 ± 0.001	0.021 ± 0.001*

NP and LP. n=20 litters/group. Data expressed as the mean ± S.E.M.. \* p <0.05. T-test



841 **3.2.1 Male Offspring Parameters at PND1, PND7 and PND14**

842 It was observed at all time points (PND1, PND7, and PND14) that AGD, body length  
843 and relative AGD were lower in the LP animals when compared to the NP groups (Table 4).  
844

**Table 4.** AGD and body length at PND 1, PND7 and PND14 in NP and LP male offspring.

<i>Parameters (mm)</i>	<i>PND1</i>		<i>PND7</i>		<i>PND14</i>	
	<b>NP</b>	<b>LP</b>	<b>NP</b>	<b>LP</b>	<b>NP</b>	<b>LP</b>
AGD	2.99 ± 0.03	2.59 ± 0.05*	5.699±0.17	4.349±0.14*	9.66 ± 0.32	6.13 ± 0.15*
Body length	49.13 ± 0.32	47.46 ± 0.21*	68.37±0.81	58.55±0.74*	83.58 ± 2.33	60.37 ± 1.20*
Relative AGD	0.061 ± 0.001	0.055 ± 0.001*	0.0832±0.002	0.0746±0.002*	0.1134 ± 0.003	0.1026 ± 0.003*

Data expressed as the mean ± S.E.M. \* p <0.05. T-test

845 The LP animal's body weights, at all ages, were also lower when compared with the NP  
846 animals. At PND1 we observed that only the prostate complex (all lobes) weights were lower  
847 in the LP animals when compared with the NP animals. At PND7 the testes, epididymis,  
848 prostate complex and liver weights were lower in the LP animals; however, with the exception  
849 of the epididymis and liver, all the relative organs weights were higher in the LP animals as  
850 compared to NP animals. At PND14 all the organs weights were lower in the LP animals, but  
851 the relative testes, epididymis and seminal vesicle were higher when compared with the NP  
852 animals (Table 5).  
853

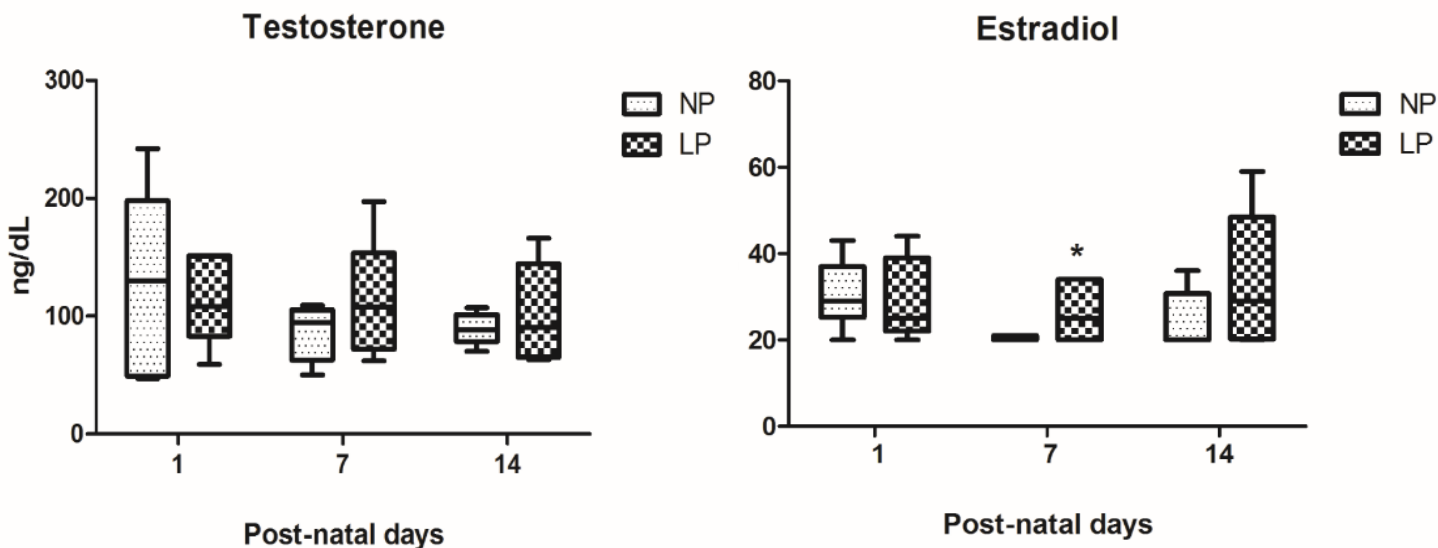
**Table 5.** Body weight and absolute and relative organs weight at P1, 7 and 14.

Parameters	PND1		PND7		PND14	
	NP	LP	NP	LP	NP	LP
Body weight (g)	6.710±0.397	5.786±0.096*	16.33±0.4776	9.386±0.3287*	35.36 ± 0.73	14.01 ± 0.41*
Testis (mg)	2.088±0.07952	2.05±0.08630	9.613±0.3579	7.268±0.3866*	39.32 ± 1.05	18.48 ± 0.93*
Testis (mg/100g)	0.3204±0.0174	0.3426±0.0135	0.5975±0.01818	0.7795±0.03837*	111.80 ± 3.36	137.50 ± 5.31*
Epididymis (mg)	1.953±0.2301	1.444±0.1903	5.906±0.0052	3.821±0.0031*	11.02 ± 0.57	7.25 ± 0.62*
Epididymis (mg/100g)	0.3042±0.03654	0.2507±0.03878	0.3558±0.02853	0.3866±0.02695	31.06 ± 1.34	52.70 ± 4.21*
Epididymal fat pad (mg)	-	-	-	-	28.44 ± 3.13	3.59 ± 0.28*
Epididymal fat pad (mg/100g)	-	-	-	-	73.56 ± 5.48	25.80 ± 1.99*
Prostate complex (mg)	37.71x10 <sup>2</sup> ±1.354	11.11x10 <sup>2</sup> ±0.5140*	3.771x10±1.354	2.439x10±0.7918*	-	-
Prostate complex (mg/100g)	2.002±0.06819	1.935±0.1173	2.319±0.06640	2.601±0.01083*	-	-
Ventral prostate (mg)	-	-	-	-	6.13 ± 0.49	2.38 ± 0.15*
Ventral prostate (mg/100g)	-	-	-	-	17.37 ± 1.20	17.43 ± 1.29
Seminal vesicle (mg)	-	-	-	-	5.35 ± 0.30	2.68 ± 0.13*
Seminal vesicle (mg/100g)	-	-	-	-	15.26 ± 0.93	19.13 ± 0.88*
Liver (g)	0.2940±0.00824	0.2646±0.0133	0.4296±0.04546	0.2849±0.01241*	1.04 ± 0.026	0.37 ± 0.014*
Liver (g/100g)	0.04707±0.00164	0.04349±0.00194	0.02639±0.002723	0.03120±0.001649	2.94 ± 0.037	2.61 ± 0.054*

854 Values expressed as Mean±S.E.M. \*p<0.05 (test t for parametric data and Mann-Whitney for non-parametric data).

### 855 3.2.2 Hormones serum levels at PND1, PND7 and PND14

856 There was no significant difference in the Testosterone serum levels between NP and  
857 LP groups at all ages (Fig. 3A). There was a significant increase in the Estradiol serum levels  
858 at PND7 in the LP animals compared with NP group (Fig. 3B).

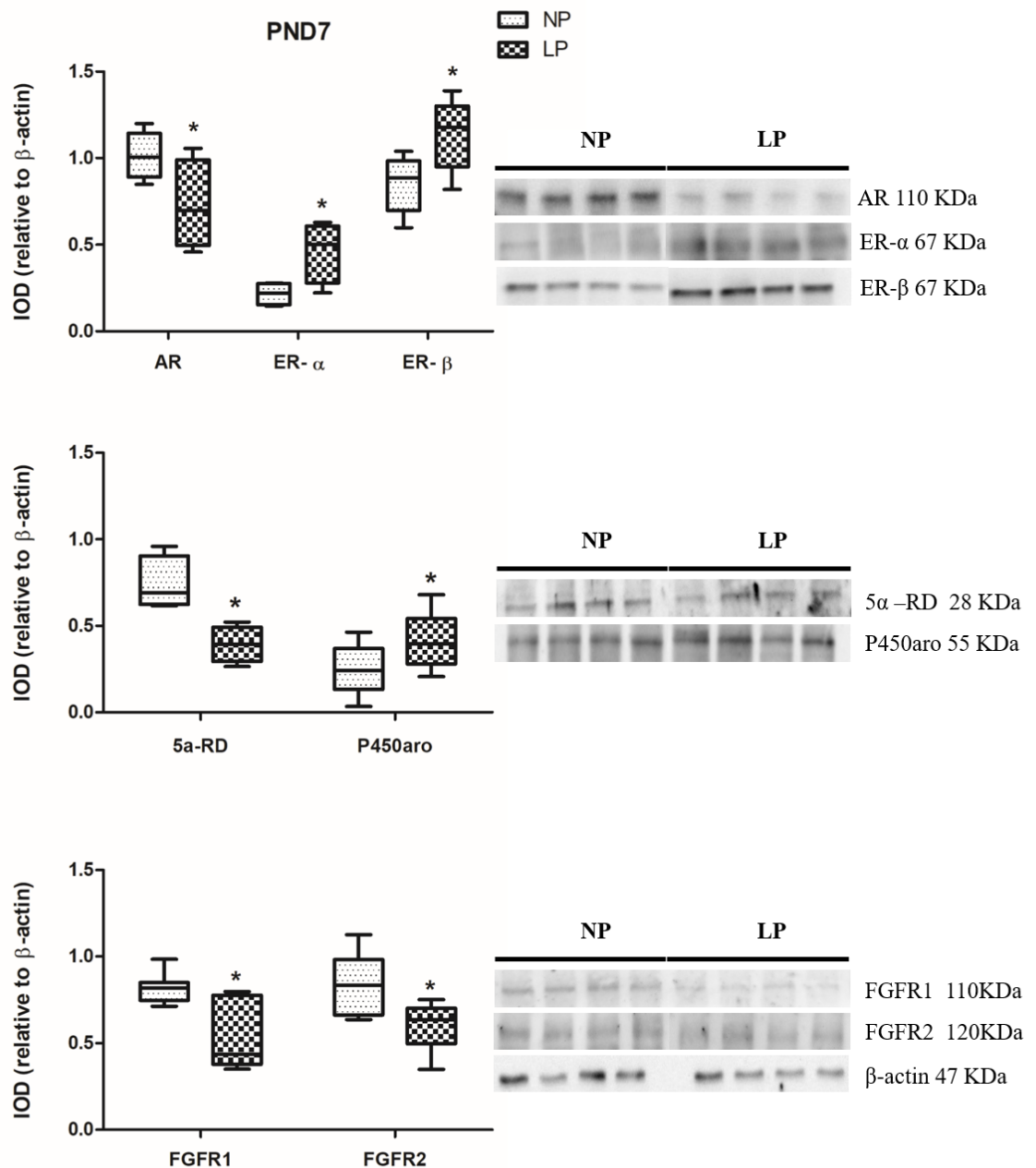


859 **Figure 3:** Testosterone (A) and Estradiol (B)  
860 serum levels assay at PND1, PND7 and PND14 male animals from NP and LP groups (n=8 pool/group).

861 Values expressed as mean  $\pm$  S.E.M. \* $p$ <0.05 T-tests for parametric data and the Mann-Whitney test for  
 862 nonparametric data.

### 863 3.2.3 Protein levels at PND7 and PND14

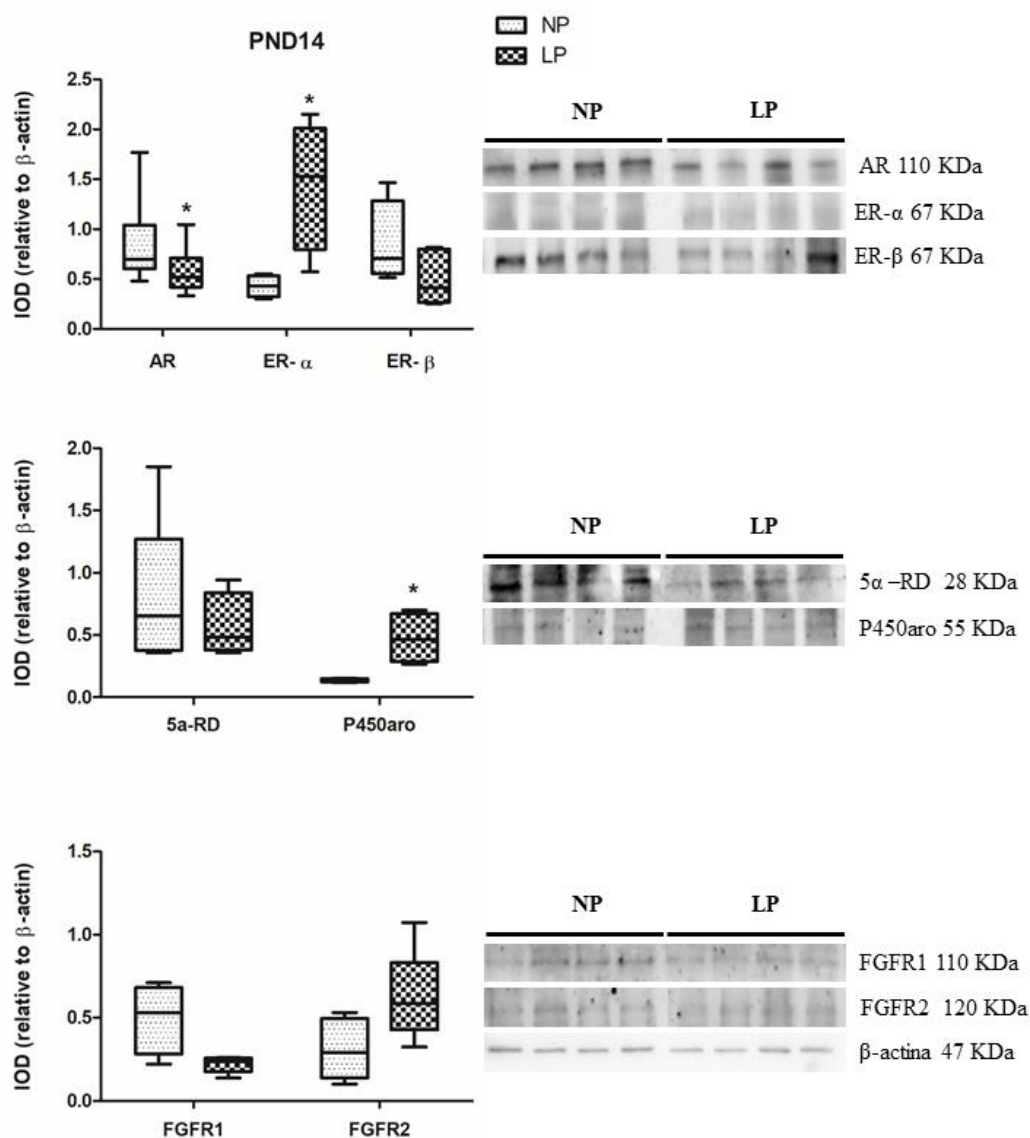
864 The levels of AR (fold-change 0.72), 5 $\alpha$ -RD (fold-change 0.53), FGFR1 (fold-change  
 865 0.64) and FGFR2 (fold-change 0.71) were lower and levels of ER- $\alpha$  (fold-change 2.13), ER- $\beta$   
 866 (fold-change 1.34) and P450aro (fold-change 1.64) were higher in LP animals compared with  
 867 NP animals at PND7 (Fig. 4).



869 **Figure 4:** Expression of AR, ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , 5 $\alpha$ -RD, P450aro, FGFR and FGFR2 in the epididymis of NP  
 870 and LP animals at PND7. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. \* $p$ <0.05. Mann-Whitney test.

871

872 At PND14, we noticed that the level of AR was still lower (fold-change 0.71) and the  
 873 ER- $\alpha$  (fold-change 3.37) and P450aro (fold-change 3.44) levels were still higher in the LP  
 874 animals compared to the NP animals. However, the levels of ER- $\beta$  (fold-change decreased  
 875 0.60), 5 $\alpha$ -RD (fold-change decreased 0.74), FGFR1 (fold-change decreased 0.44) and FGFR2  
 876 (fold-change increased 2.00) did not change significantly between the groups (Fig. 5).



877

878

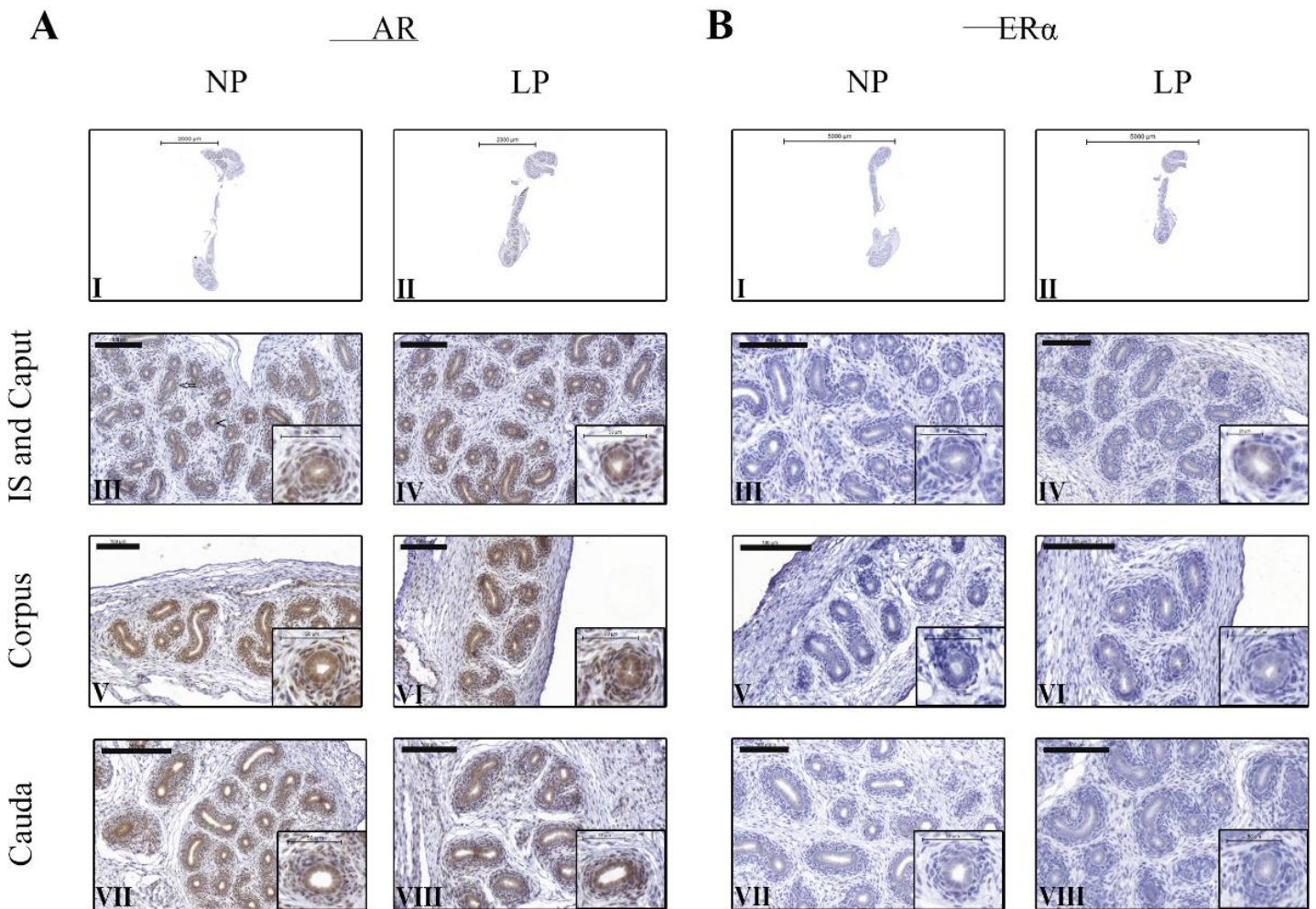
879 **Figure 5:** Expression of AR, ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , 5 $\alpha$ -RD, P450aro, FGFR and FGFR2 in the epididymis of NP  
 880 and LP animals at PND14. Data are expressed as the median  $\pm$  S.E.M. \* $p$ <0.05. Mann-Whitney test.

881

882 **3.2.4 AR and ER- $\alpha$  immunohistochemistry**

883 At PND7 we observed positive staining for AR within the epithelial cells' cytoplasm  
 884 and, more intensely, in the nucleus. In the mesenchymal cells adjacent to the tubules we could  
 885 also observe the AR staining in the nucleus (Fig. 6A). Our results showed, at this age, a very  
 886 weak staining for ER- $\alpha$  in the cytoplasm of the epithelial cells exclusively in the IS/caput region  
 887 in both groups (Fig. 6B-III and IV). But apparently ER $\alpha$  staining seems to be more evident in  
 888 the LP group (Fig. 6B-IV).

889

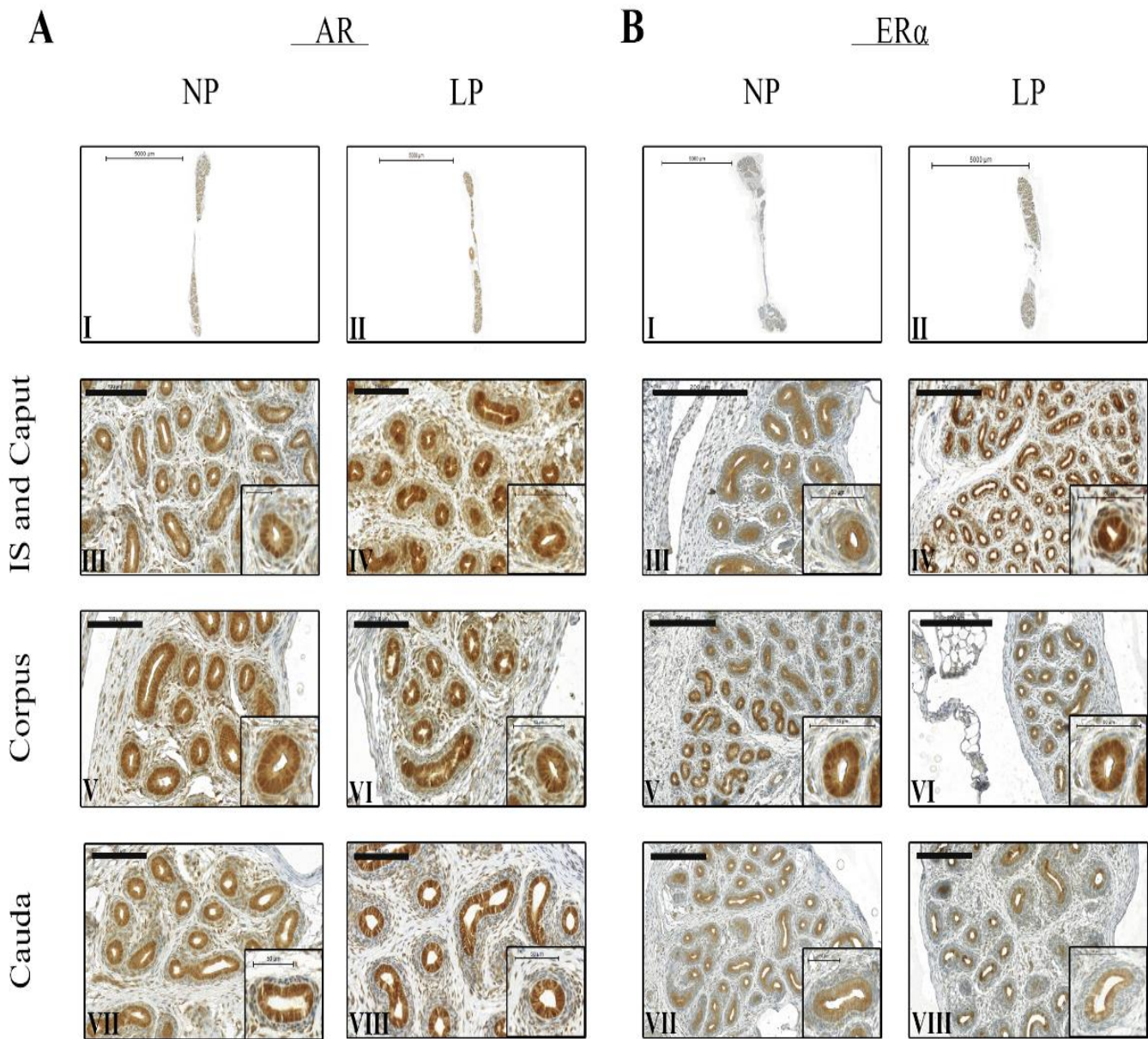


891 **Figure 6:** Epididymis sections of the initial segment (IS), caput regions, corpus and cauda from the NP  
 892 and LP animals at PND7 subjected to AR (A) and ER $\alpha$  (B) immunostaining. NP = normoprotein  
 893 animals; LP = low-protein animals.

894

895 At PND14 we also noticed a positive staining for AR in the epithelial and mesenchymal  
 896 cells 'cytoplasm and, more intensely, in the nucleus in both experimental groups and in all the  
 897 regions (Fig. 7A). However, in the IS/caput from LP group (Fig. 7A-IV), we observed a

898 stronger staining in the epithelial cells when compared to the same type of cell in the NP group  
 899 (Fig. 7A-III). Interesting, we noticed that there was a stronger staining within the mesenchymal  
 900 cells present in the LP group (Fig. 7a-IV) than in the NP group (Fig. 7A-III). This could mean  
 901 a delay in the mesenchymal cell differentiation. A positive staining for ER- $\alpha$  was observed  
 902 within the epithelial cells in all the regions at both groups in this age (Fig. 7BWe also noticed  
 903 a stronger staining for this receptor in the LP group IS/caput region (Fig. 7B-IV) when  
 904 compared to the same region in the NP group, demonstrating an increase of this receptor in the  
 905 LP group at PND14 (Fig. 7B-III).



907 **Figure 7:** Epididymis sections of the initial segment (IS), caput regions, corpus and cauda from the NP  
 908 and LP animals at PND14 subjected to AR (A) and ER $\alpha$  (B) immunostaining. NP = normoprotein  
 909 animals; LP = low-protein animals.

#### 910 4. DISCUSSION AND CONCLUSION

911 In the present study, we showed that maternal protein restriction during gestation and  
912 lactation change the patterns of mother`s food intake and subsequently alters maternal body  
913 and organ weights at the end of lactation. The maternal low-protein diet also increases estradiol  
914 levels of the male offspring, changes sexual parameters, such as AGD and organ weights; and  
915 modulates AR, ER- $\alpha$ , ER- $\beta$ , P450aro, 5 $\alpha$ -RD, FGFR1, and FGFR2 epididymal expression  
916 leading to a delay in the epididymal growth and differentiation patterns in the beginning of  
917 postnatal epididymal development.

918 Maternal nutrition is important for the normal development of offspring. Therefore, one  
919 of the most widely used models to investigate fetal programming is to perform maternal protein  
920 restriction diet experiments[24–27]. During gestation, pregnant female rats normally already  
921 increase food consumption due to the fact that the embryo/fetus needs more supplies, mainly  
922 protein, to grow fast in a short amount of time [28]. In our study we showed that LP pregnant  
923 rats had an increase in food intake during the gestation. This can be justified because these  
924 animals were submitted to nutrient deficient diets, so they tend to increase food intake in an  
925 attempt to compensate for their own nutritional deficiency and supplies for their embryos  
926 [28,29].

927 Even with the increased food intake, the pregnant rats` weights were not different  
928 between the groups. This may have happened because the females of the LP group due to  
929 protein deficiency, had to mobilize a large part of their energy reserves during gestation for  
930 milk production, which resulted in similar weight of LP animals when compared to the NP  
931 animals[30].

932 To keep the same calories as a normoprotein diet, more carbohydrate is used as a  
933 compensatory source in low-protein diets. Previous studies have shown that intrauterine growth  
934 restriction models decrease the weight of the offspring at birth, and smaller pups exhibit altered  
935 breastfeeding behavior, such as decreased the sucking stimulus, which has influence on the  
936 maternal appetite during lactation [31,32]. Higher carbohydrate content has also been shown to  
937 generate an animal's aversion to food during lactation [33,34]. These associations could justify  
938 why the LP pregnant rats decreased their food intake during the lactation.

939 It is known that increasing the supply of carbohydrates causes an increase in liver  
940 activity and, consequently, in organ weight in mother rats. These changes are mainly related to  
941 the synthesis of fatty acids, which may lead to the development of non-alcoholic liver  
942 steatosis[35,36]. It is therefore possible that the increase in the relative weight of livers of LP

943 mothers was a result of increased liver activity as a consequence of the high amount of  
944 carbohydrates present in their diets [37,38].

945 The reduction in kidney weight of animals treated with a low-protein diet has already  
946 been observed by Gao et al. (2010) [39] and De Miguel et al. (2011)[40]. These data corroborate  
947 the reduction in absolute and relative renal weight found in the mothers of the LP group in our  
948 study, which may have occurred due to the reduction of renal metabolism in these animals.

949 Gestational performance is an important parameter in studies that use maternal  
950 malnutrition as an experimental model. It refers to data collected on the day of offspring birth  
951 and presents relevant information regarding the gestation and the development of the offspring  
952 [41]. A low birth weight is an important sign of malnutrition during pregnancy and is therefore  
953 a crucial indicator of slow fetal growth. We demonstrated that protein deficiency significantly  
954 reduces the weight and the length of male pups, in agreement with results obtained in others  
955 studies[6,8,44,45].

956 The weight of the genital organs is also an important parameter when assessing the  
957 impact of a particular condition on the development of genitalia which consequently affects  
958 sperm quality and fertility of the adult individuals. Therefore, the relative weights of the testes,  
959 epididymis, seminal vesicle and prostate can be used to evaluate reproductive risk. These  
960 analyses are important because the decrease in the weight of the reproductive organs may  
961 indicate specific adverse effect of the treatment/diet on the male genital system [46].

962 The decrease in the absolute weight of the organs of LP animals compared to the same  
963 organs in NP animals is justified by the fact that body structure and development are directly  
964 affected by the low protein intake. However, the increase or maintenance in relative weight in  
965 the testis and epididymis in the LP animals at PND7 and PND14 may be a response in an  
966 attempt to preserve their full functionality despite the poor nutritional environment in which  
967 they were exposed during their development and early postnatal stages.

968 Androgens and estrogens play an important role in the regulation of the different organs  
969 and systems physiology. They are responsible for modulating important biochemical signaling  
970 pathways in human and rodents. They also affect growth and/or maintenance of functions in  
971 tissues and organs such as muscle, adipose tissue, liver, bone, and central nervous system, as  
972 well as affect development and maintenance of the male genital system [47,48].

973 The neonatal period is an extension of gestation. Indeed, there are several maturational  
974 processes that occur prenatally in humans and postnatally in rodents. The transition from  
975 neonate to infant is gradual, occurring between PND4 and PND7 in rodents and from birth to  
976 two months in humans[49].



977 In rats, males show higher plasma testosterone concentrations than females across the  
978 development. In the hours after birth, males show a peak in circulating testosterone, which then  
979 decreased and remained low between PND1 and PND19. Serum estradiol concentrations, in  
980 both female and male rats, are higher at birth than in the hours and days that follow. After birth,  
981 this hormone is maintained at low concentrations until a peak around PND15 which reaches  
982 levels above those observed in adulthood[50].

983 Anogenital distance (AGD), areolas/nipples regression, testicular descent and preputial  
984 separation in male rats are important biomarkers for proper prenatal androgen exposure during  
985 gestation and lactation, especially testosterone synthesized by fetal testes. These biomarkers  
986 are used to evaluate intrauterine development. Maternal protein restriction alters AGD in male  
987 offspring, which suggests an impairment of hypothalamic–hypophyseal–gonadal axis and is  
988 associated with genital malformations, feminization/estrogenization, impaired sexual behavior  
989 and/or even infertility in adulthood (Zambrano 2005) [51–53].

990 Rinaldi et al. (2013) showed a shorter AGD (approximately 33% compared to the  
991 control) in male pups whose mothers received a low-protein diet during gestation and this study  
992 associated this result with a decrease in dihydrotestosterone (DHT) serum level in male rats at  
993 PND30 [54]. We noticed that the LP animals had a decreased in AGD at birth (PND1) and this  
994 parameter remained reduced until DPN14; however, there was no difference in the T serum  
995 levels between the groups. Instead of a decrease in T levels, a non-significant increase of T was  
996 observed at DPN7 and DPN14 followed by an increase in E2 serum levels. Thus, we  
997 hypothesize that this may not be an anti-androgenic effect but an estrogenic effect from the  
998 maternal low-protein diet.

999 Before the first wave of testicular fluid at PND15, the T present in the epididymis  
1000 coming from the blood supply. T, either directly or via its main metabolite, DHT, is important  
1001 for the epididymal development, cellular morphology and functionality. They regulate  
1002 epithelial cells proliferation, protein synthesis and secretion, and acts through their receptors,  
1003 the androgen receptor (AR)[55,56]. Both are correlated with levels of AR expression in luminal  
1004 epithelial cells in adults and in mesenchymal cells during epididymal development, in all the  
1005 epididymal regions. In this study, we observed at PND7 and PND14 a decrease in AR and 5 $\alpha$ -  
1006 RD protein levels in the epididymal tissue. Our results indicate that probably less T is coming  
1007 from bloody supply and less DHT is being converted in the epididymis. Thereby, the decrease  
1008 of androgen levels already showed to lead the epididymal development to a negative  
1009 consequences, which may alters the epididymis morphology leading a tubular atrophy and a  
1010 decrease in the lumen size [57].

1011 Through AR immunostaining we observed a positive staining in the epithelium and  
1012 mesenchymal cells in all the regions at both ages. However, if we compared the proximal  
1013 regions between the groups, mainly at PND14, we observed a stronger staining in LP group in  
1014 both cell types.

1015 During fetal life, the immunostaining for AR in the epididymis is primarily found in  
1016 mesenchymal cells and appears to be evenly distributed among all the regions, whereas marking  
1017 on epithelial cells should be less evident and non-uniform. After birth, the AR expression in the  
1018 epididymis change it staining pattern, and starts to become more intense in the epithelial cells  
1019 [58]. In this study we observed a larger amount of AR positive in the mesenchymal cells in the  
1020 LP groups when compared to NP groups. At this age, there should be not such a strong staining  
1021 in this type of cell. So, our results suggest that maternal protein restriction causes a delay on  
1022 the mesenchymal cells differentiation by way of AR expression.

1023 At the same time, AR immunostaining also showed a stronger staining in the epithelium  
1024 cells in the LP group in the proximal region when compared the same region to NP group.  
1025 Recently, we showed that maternal protein restriction resulted in a low microvascular density  
1026 associated with an impaired bloody supply in IS at PND14. Blood flow to the IS is higher than  
1027 in any other regions of the epididymis (relation between capillary flow volume and local cell  
1028 metabolic rate), being metabolically very active and it is critically dependent directly by the  
1029 circulating androgens at this age [13,59]. So, based on that, we hypothesize that the increased  
1030 of AR epithelium cells expression in the proximal region was an attempt to capture more T or  
1031 DHT due to the importance of this region for the male fertility.

1032 It is known that T could be also converted in  $17\beta$ oestradiol (E2) by enzyme P450aro in  
1033 the epididymis caput luminal space and epithelium in rats and humans, and E2 action is  
1034 mediated by estrogen receptors type  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ )[15,60,61]. Recently evidences  
1035 suggestes that P450aro present in the epididymis, signal the important role of estrogens on the  
1036 regulation of development, the maintenance of differentiated epithelial morphology and in the  
1037 regulation of epididymal fluid [14].

1038 Besides the decrease of 5 $\alpha$ -RD expression at PND7 and PND14, we also observed a  
1039 significantly increase in the P450aro, followed by an increase in the ER $\alpha$  and ER $\beta$  protein levels  
1040 in the LP epididymis. These results reinforce the hypothesis that less T is being converted into  
1041 DHT, and suggests that more T is being converted into E2 in the epididymal tissue.

1042 Atanassova et. al., (2001) showed that AR and ER expression in males must be carefully  
1043 examined together and that these receptors and their respective steroid ligands should not be  
1044 studied independently, as it is the balance between the two hormonal pathways that is important

1045 in the male, particularly during development [62]. As Mitchell (2013) concludes, central  
1046 importance in male reproductive development is the androgen and estrogen balance, and not  
1047 just androgens alone[17].

1048 The proximal regions of the epididymis express higher concentrations of estrogen  
1049 receptors, ER- $\alpha$  and ER- $\beta$  [59]. ER- $\alpha$  expression varies with age and animal species.  
1050 Atanassova et al. (2001) [62] observed absence staining for this receptor in epididymal  
1051 epithelial cells, at P10, in rats. They only observed the expression of ER- $\alpha$ , in these cells, at  
1052 P18. As also, they showed that the staining was positive in all the epididymal regions, but the  
1053 expression was higher in the IS and caput.

1054 Our study was the first to demonstrated ER- $\alpha$  positive staining at PND14 in rats. We  
1055 observed the same staining pattern that was previously described by Atassanova et al. (2001)  
1056 [62], in animals at P18. When the regions were compared between our experimental groups,  
1057 we noticed that the IS and caput has more intense staining in the LP animals. So, this result  
1058 suggest that a maternal protein restriction diet is capable of altering the estradiol mechanism in  
1059 the epididymal development mediated by ER $\alpha$  expression. Unfortunately, efforts to immune  
1060 localize ER $\beta$  have not provided consistent results in the epididymal tissue and discrepancies  
1061 occur throughout the literature [63,64].

1062 Most of the initial studies related to E2 in males were focused on pathology caused by  
1063 exposure of males to the “female hormone,” because it was unclear that this hormone was  
1064 having a normal physiological function in the male [14]. These previously studies showed that  
1065 male animals which were exposed during fetal or neonatal life to an exogenous estrogen have  
1066 more pronounced defects, resulting from an early estrogenization[65]. After birth these  
1067 abnormalities, occurred in the reproductive system, included retained testes, epididymal cysts,  
1068 distended seminal vesicles and retained Mullerian ducts. These animals, at the adult age, also  
1069 showed to have abnormal sperm, reduced fertility and increased testicular cancer [66].

1070 Zambrano et al., (2005) showed that the maternal protein restriction increases maternal  
1071 estradiol at gestational day 19 in rats, but none study verified the offspring estradiol serum  
1072 levels at such young ages. A significant elevation in endogenous serum estradiol, which was  
1073 associated postnatally with adverse reproductive outcomes referred to as the "fetal  
1074 estrogenization syndrome (FES)". This fetal estrogenization syndrome can alter the  
1075 development of the male reproductive system leading the male offspring to structural  
1076 malformations including cryptorchidism, epididymal cysts and retained Mullerian ducts [67].

1077 Pinilla et al. (1989) showed that after a neonatal estrogenization in male rat, there was  
1078 no formation of DHT in the caput epididymis at P22, indicating that a neonatal estrogenization

1079 may induce important changes in T metabolism in the epididymal postnatal development, but  
1080 little is known about the influence of high concentrations of estradiol on the epididymal  
1081 postnatal development[68].

1082         Androgens are the primary factors regulating epididymal development and function.  
1083 Over recent years, new studies have shown that growth factors also play important roles in  
1084 epididymis regulation and maintenance. It has become clear that Fibroblast growth factors  
1085 (FGF) signaling is involved in the development and normal functioning of male reproductive  
1086 organs, such as the testis and epididymis[69].

1087         FGFs are a large family of multifunctional growth factors that regulate cellular  
1088 processes, such as proliferation and differentiation, and are therefore important during  
1089 embryogenesis and in maintaining adult tissue homeostasis. FGFs signal through FGF receptors  
1090 (FGFRs 1–4), which are plasma membrane-spanning receptor tyrosine kinases, are partitioned  
1091 between the epithelial and mesenchymal compartments and underlie directionally specific and  
1092 reciprocal communication between the two compartments[69].

1093         At birth, the epididymal duct is poorly developed and most of the neonatal organ volume  
1094 is occupied by mesenchymal tissue. During the first days after birth, rodent's epididymis  
1095 undergoes extensive remodeling; the duct elongates and convolutes, extending into the space  
1096 previously occupied by mesenchymal cells. Little is known about FGFs in the epididymis  
1097 development, but seems that at early stages of epididymal postnatal development, FGFR1 is  
1098 specifically expressed in the undifferentiated mesenchyme and is responsible for regulating  
1099 epididymal mesenchyme development though cells proliferation and differentiation control,  
1100 and FGFR2 has been associated with epithelial cells proliferation and cytodifferentiation  
1101 promotion[69,70].

1102         FGFR2 have been described as the most extensive gene among FGFs throughout the  
1103 WD epithelium and is essential for the duct maintenance. This protein acts as a regulator of cell  
1104 proliferation, cytodifferentiation, motility and apoptosis, and also is important for sperm  
1105 motility in the adulthood. In the early stages of epididymal postnatal development, FGFR2 has  
1106 been associated with epithelial cells proliferation and cytodifferentiation promotion, and shows  
1107 to be androgen dependent[71]. Our results showed a decreased in FGFR1 and FGFR2  
1108 expression at PDN7. These results hypothesize that the delay observed in the mesenchymal and  
1109 epithelial cells via AR expression may be associated with FGFR1 and FGFR2 expression,  
1110 respectively, leading to a delay in cytodifferentiation the early stages of postnatal epididymal  
1111 development.

1112           Therefore, our results showed that maternal protein restriction causes an increase in the  
 1113 male offspring circulating estradiol and, in the epididymis, the association with high estradiol  
 1114 concentration coming from the bloodstream and more T being converted into E2 by the action  
 1115 of P450aro, lead to an impairment at initial stage of epididymal development and  
 1116 cytodifferentiation modulated through AR and FGFR1 and 2 molecular pathways. Thus, a low-  
 1117 protein maternal diet during gestation and lactation lead to an impairment in epididymal  
 1118 development in the early postnatal development of male offspring.

1119

## 1120 5. REFERENCES

- 1121 1. Cheong, J.N.; Wlodek, M.E.; Moritz, K.M.; Cuffe, J.S.M. Programming of maternal  
 1122 and offspring disease: impact of growth restriction, fetal sex and transmission across  
 1123 generations. *J. Physiol.* 2016.
- 1124 2. Luca Boeri, Eugenio Ventimiglia, Paolo Capogrosso, Silvia Ippolito, Angela Pecoraro,  
 1125 Marco Paciotti, Roberta Scano, Alessandro Galdini, Luca Valsecchi, Enrico Papaleo,  
 1126 Francesco Montorsi, and A.S.\* Low Birth Weight Is Associated with a Decreased  
 1127 Overall Adult Health Status and Reproductive Capability – Results of a Cross-  
 1128 Sectional Study in Primary Infertile Patients. *PLoS One* **2016**, *11*.
- 1129 3. Faure, C.; Dupont, C.; Chavatte-Palmer, P.; Gautier, B.; Levy, R. Are semen  
 1130 parameters related to birth weight? *Fertil. Steril.* **2015**.
- 1131 4. Miyamoto, T.; Minase, G.; Shin, T.; Ueda, H.; Okada, H.; Sengoku, K. Human male  
 1132 infertility and its genetic causes. *Reprod. Med. Biol.* 2017.
- 1133 5. Fleming, T.P.; Watkins, A.J.; Sun, C.; Velazquez, M.A.; Smyth, N.R.; Eckert, J.J. Do  
 1134 little embryos make big decisions? How maternal dietary protein restriction can  
 1135 permanently change an embryo's potential, affecting adult health. *Reprod. Fertil. Dev.*  
 1136 **2015**.
- 1137 6. Zambrano, E.; Rodríguez-González, G.L.; Guzmán, C.; García-Becerra, R.; Boeck, L.;  
 1138 Díaz, L.; Menjivar, M.; Larrea, F.; Nathanielsz, P.W. A maternal low protein diet  
 1139 during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J.*  
 1140 *Physiol.* **2005**.
- 1141 7. Toledo, F.C.; Perobelli, J.E.; Pedrosa, F.P.C.; Anselmo-Franci, J.A.; Kempinas,  
 1142 W.D.G. In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in  
 1143 adult male rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2011**.

- 1144 8. Rodríguez-González, G.L.; Reyes-Castro, L.A.; Vega, C.C.; Boeck, L.; Ibáñez, C.;  
1145 Nathanielsz, P.W.; Larrea, F.; Zambrano, E. Accelerated aging of reproductive  
1146 capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased  
1147 testicular and sperm oxidative stress. *Age (Omaha)*. **2014**.
- 1148 9. Rinaldi, J.C.; Santos, S.A.A.; Colombelli, K.T.; Birch, L.; Prins, G.S.; Justulin, L.A.;  
1149 Felisbino, S.L. Maternal protein malnutrition: effects on prostate development and  
1150 adult disease. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2018**.
- 1151 10. Staack A, Donjacour AA, Brody J, Cunha GR, C.P. Mouse urogenital development: a  
1152 practical approach. *Differentiation*. **2003**.
- 1153 11. Aki Murashima Shinichi Miyagawa Yukiko Ogino Hisayo Nishida-Fukuda Kimi  
1154 Araki Takahiro Matsumoto Takehito Kaneko Kazuya Yoshinaga Ken-ichi  
1155 Yamamura Takeshi Kurita Shigeaki Kato Anne M. Moon Gen Yamada Essential  
1156 Roles of Androgen Signaling in Wolffian Duct Stabilization and Epididymal Cell  
1157 Differentiation. *Endocrinology* **2011**, 152.
- 1158 12. ROBERT E. GLOYNA JEAN D. WILSON A Comparative Study of the Conversion  
1159 of Testosterone to 17 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-3-one (Dihydrotestosterone) by Prostate  
1160 and Epididymis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1969**, 12.
- 1161 13. Robaire B, H.N. Actions of 5 $\alpha$ -reductase inhibitors on the epididymis. *Mol Cell*  
1162 *Endocrinol.* **2006**.
- 1163 14. Hess, R.A.; Cooke, P.S. Estrogen in the male: A historical perspective. *Biol. Reprod.*  
1164 2018.
- 1165 15. Joseph A, Shur BD, H.R. Estrogen, efferent ductules, and the epididymis. *Biol Reprod.*  
1166 **2011**.
- 1167 16. Nanjappa MK, Hess RA, Medrano TI, Locker SH, Levin ER, C.P. Membrane-  
1168 Localized Estrogen Receptor 1 Is Required for Normal Male Reproductive  
1169 Development and Function in Mice. *Endocrinology*. **2016**.
- 1170 17. Mitchell RT, Sharpe RM, Anderson RA, McKinnell C, Macpherson S, Smith LB,  
1171 Wallace WH, Kelnar CJ, van den D.S. Diethylstilboestrol exposure does not reduce  
1172 testosterone production in human fetal testis xenografts. *PLoS One* **2013**.
- 1173 18. Lindzey, J.; Vijay Kumar, M.; Grossman, M.; Young, C.; Tindall, D.J. Molecular  
1174 Mechanisms of Androgen Action. In; 1994.
- 1175 19. Cardone, A.; Angelini, F.; Varriale, B. Autoregulation of estrogen and androgen  
1176 receptor mRNAs and downregulation of androgen receptor mRNA by estrogen in  
1177 primary cultures of lizard testis cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1998**.

- 1178 20. Kitagaki, J.; Ueda, Y.; Chi, X.; Sharma, N.; Elder, C.M.; Truffer, E.; Costantini, F.;  
1179 Lewandoski, M.; Perantoni, A.O. FGF8 is essential for formation of the ductal system  
1180 in the male reproductive tract. *Development* **2011**.
- 1181 21. Ornitz, D.M.; Itoh, N. Protein family review Fibroblast growth factors Gene  
1182 organization and evolutionary history. *Genome* **2001**.
- 1183 22. Okazawa, M.; Murashima, A.; Harada, M.; Nakagata, N.; Noguchi, M.; Morimoto, M.;  
1184 Kimura, T.; Ornitz, D.M.; Yamada, G. Region-specific regulation of cell proliferation  
1185 by FGF receptor signaling during the Wolffian duct development. *Dev. Biol.* **2015**.
- 1186 23. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram  
1187 quantities of protein utilizing the principle of protein– dye binding. *Anal. Biochem.*  
1188 **1976**, 72, 248–254.
- 1189 24. Grissom N, Bowman N, R.T. Epigenetic programming of reward function in offspring:  
1190 a role for maternal diet. *Mamm Genome.* **2014**.
- 1191 25. Carolan-Olah, M.; Duarte-Gardea, M.; Lechuga, J. A critical review: early life nutrition  
1192 and prenatal programming for adult disease. *J. Clin. Nurs.* 2015.
- 1193 26. Liu X, Wang J, Gao L, Jiao Y, L.C. Maternal Protein Restriction Induces Alterations in  
1194 Hepatic Unfolded Protein Response-Related Molecules in Adult Rat Offspring. *Front*  
1195 *Endocrinol* **2018**.
- 1196 27. Lee, H.S. Impact of maternal diet on the epigenome during in utero life and the  
1197 developmental programming of diseases in childhood and adulthood. *Nutrients* 2015.
- 1198 28. Gao H, Tanchico DT, Yallampalli U, Balakrishnan MP, Y.C. Appetite regulation is  
1199 independent of the changes in ghrelin levels in pregnant rats fed low-protein diet.  
1200 *Physiol Rep* **2015**.
- 1201 29. Widdowson, E.M.; McCance, R.A. A review: New thoughts on growth. *Pediatr. Res.*  
1202 **1975**.
- 1203 30. Torres N, Bautista CJ, Tovar AR, Ordáz G, Rodríguez-Cruz M, Ortiz V, Granados O,  
1204 Nathanielsz PW, Larrea F, Z.E. Protein restriction during pregnancy affects maternal  
1205 liver lipid metabolism and fetal brain lipid composition in the rat. *Am J Physiol*  
1206 *Endocrinol Metab* **2010**.
- 1207 31. ZEMAN, F.J. Effect of the young rat of maternal protein restriction. *J Nutr* **1967**.
- 1208 32. Cherala, G.; Shapiro, B.H.; D'mello, A.P. *The Journal of Nutrition Nutrient*  
1209 *Requirements and Optimal Nutrition Two Low Protein Diets Differentially Affect Food*  
1210 *Consumption and Reproductive Performance in Pregnant and Lactating Rats and*  
1211 *Long-Term Growth in Their Offspring 1*; 2006; Vol. 136;.

- 1212 33. WILSON, J.F. Effects of pregnancy, sucrose, and various low-protein diets on the  
1213 eating behavior of rats. *Physiol. Behav.* **1997**.
- 1214 34. PINE, A. P.; JESSOP, N. S.; OLDHAM, J.D. Maternal protein reserves and their  
1215 influence on lactational performance in rats. 3. The effects of dietary protein restriction  
1216 and stage of lactation on milk composition. *Br J Nutr* **1994**.
- 1217 35. Esther Ooi;Theodore Ng;Gerald Watts;P. Hugh Barrett; Dietary fatty acids and  
1218 lipoprotein metabolism: new insights and updates. *Curr Opin Lipidol.* **2013**.
- 1219 36. Basaranoglu M, Basaranoglu G, B.E. Carbohydrate intake and nonalcoholic fatty liver  
1220 disease: fructose as a weapon of mass destruction. *Hepatobiliary Surg Nutr.* **2015**.
- 1221 37. Ballen, M.L.O.; Moretto, V.L.; Santos, M.P. dos; Gonçalves, T.S.S.; Kawashita, N.H.;  
1222 Stoppiglia, L.F.; Martins, M.S.F.; Gomes-da-Silva, M.H.G. Restrição protéica na  
1223 prenhez: efeitos relacionados ao metabolismo materno. *Arq. Bras. Endocrinol.*  
1224 *Metabol.* **2009**.
- 1225 38. Kwon, D.-H.; Kang, W.; Nam, Y.S.; Lee, M.S.; Lee, I.Y.; Kim, H.J.; Rajasekar, P.;  
1226 Lee, J.-H.; Baik, M. Dietary protein restriction induces steatohepatitis and alters  
1227 leptin/signal transducers and activators of transcription 3 signaling in lactating rats. *J.*  
1228 *Nutr. Biochem.* **2012**, 23, 791–799.
- 1229 39. Gao, X.; Wu, J.; Dong, Z.; Hua, C.; Hu, H.; Mei, C. A low-protein diet supplemented  
1230 with ketoacids plays a more protective role against oxidative stress of rat kidney tissue  
1231 with 5/6 nephrectomy than a low-protein diet alone. *Br. J. Nutr.* **2010**, 103, 608.
- 1232 40. De Miguel, C.; Lund, H.; Mattson, D.L. High dietary protein exacerbates hypertension  
1233 and renal damage in dahl SS rats by increasing infiltrating immune cells in the kidney.  
1234 *Hypertension* **2011**.
- 1235 41. Jahan-mihan, A.; Labyak, C.A.; Arikawa, A.Y. The effect of characteristics of proteins  
1236 fed during gestation and lactation on development of metabolic syndrome in dams and  
1237 male offspring of Wistar rats. *Obes. Sci. Pract.* **2017**.
- 1238 42. Hales, C.; Barker, D. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty  
1239 phenotype hypothesis. *Int. J. Epidemiol.* **2013**, 42, 1215–1222.
- 1240 43. Gluckman PD, H.M. The Consequences of Being Born Small – An Adaptive  
1241 Perspective. *Horm Res* **2006**.
- 1242 44. Qasem, R.J.; Li, J.; Tang, H.M.; Pontiggia, L.; D’mello, A.P. Maternal protein  
1243 restriction during pregnancy and lactation alters central leptin signalling, increases  
1244 food intake, and decreases bone mass in 1 year old rat offspring. *Clin. Exp. Pharmacol.*  
1245 *Physiol.* **2016**.



- 1246 45. Qasem, R.J.; Yablonski, E.; Li, J.; Tang, H.M.; Pontiggia, L.; D'mello, A.P.  
1247 Elucidation of thrifty features in adult rats exposed to protein restriction during  
1248 gestation and lactation. *Physiol. Behav.* **2012**, *105*, 1182–1193.
- 1249 46. CLEGG, E. D.; PERREAULT, S. D.; KLINEFELTER, G.R. *Principles and Methodes*  
1250 *of Toxicology: Assessment of Male Reproductive Toxicity*; HAYES, A.W., Ed.;  
1251 Philadelphia: Taylor & Francis, 2011;
- 1252 47. Zaya, R.; Hennick, C.; Pearl, C.A. In vitro expression of androgen and estrogen  
1253 receptors in prepubertal and adult rat epididymis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2012**, *178*,  
1254 573–586.
- 1255 48. Abdulmageed M. Traish Negative Impact of Testosterone Deficiency and 5 $\alpha$ -Reductase  
1256 Inhibitors Therapy on Metabolic and Sexual Function in Men. *Sex Gend. Factors*  
1257 *Affect. Metab. Homeostasis, Diabetes Obes.* **2017**.
- 1258 49. Brust, V.; Schindler, P.M.; Lewejohann, L. Lifetime development of behavioural  
1259 phenotype in the house mouse (*Mus musculus*). *Front. Zool.* 2015.
- 1260 50. Döhler, K.D.; Wuttke, W. Changes with age in levels of serum gonadotropins,  
1261 prolactin, and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology*  
1262 **1975**.
- 1263 51. Bustamante-Montes, L.P.; Hernández-Valero, M.A.; Flores-Pimentel, D.; García-  
1264 Fábila, M.; Amaya-Chávez, A.; Barr, D.B.; Borja-Aburto, V.H. Prenatal exposure to  
1265 phthalates is associated with decreased anogenital distance and penile size in male  
1266 newborns. *J. Dev. Orig. Health Dis.* **2013**, *4*, 300–306.
- 1267 52. Xie, C.; Zhao, Y.; Gao, L.; Chen, J.; Cai, D.; Zhang, Y. Elevated phthalates' exposure  
1268 in children with constitutional delay of growth and puberty. *Mol. Cell. Endocrinol.*  
1269 **2015**, *407*, 67–73.
- 1270 53. Putz, O.; Schwartz, C.B.; LeBlanc, G. a; Cooper, R.L.; Prins, G.S. Neonatal low- and  
1271 high-dose exposure to estradiol benzoate in the male rat: II. Effects on male puberty  
1272 and the reproductive tract. *Biol. Reprod.* **2001**, *65*, 1506–1517.
- 1273 54. Rinaldi, J.C.; Justulin, L.A.; Lacorte, L.M.; Sarobo, C.; Boer, P.A.; Scarano, W.R.;  
1274 Felisbino, S.L. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth,  
1275 maturation and aging. *Life Sci.* **2013**.
- 1276 55. Zhu LJ, Hardy MP, Inigo IV, Huhtaniemi I, Bardin CW, M.-Y.A. Effects of androgen  
1277 on androgen receptor expression in rat testicular and epididymal cells: a quantitative  
1278 immunohistochemical study. *Biol Reprod* **2000**.
- 1279 56. Trybek G, Kolasa A, Marchlewicz M, Wenda-Rózewicka L, W.B. Immunolocalization

- 1280 of androgen receptor in the epididymis of rats with dihydrotestosterone deficiency.  
1281 *Reprod Biol.* **2005**.
- 1282 57. Falvo, S.; Di Fiore, M.M.; Burrone, L.; Chieffi Baccari, G.; Longobardi, S.; Santillo,  
1283 A. Androgen and oestrogen modulation by D-aspartate in rat epididymis. *Reprod.*  
1284 *Fertil. Dev.* **2015**.
- 1285 58. You, L.; Sar, M. Androgen receptor expression in the testes and epididymides of  
1286 prenatal and postnatal Sprague-Dawley rats. *Endocrine* **1998**.
- 1287 59. Yamashita, S. Localization of estrogen and androgen receptors in male reproductive  
1288 tissues of mice and rats. *Anat. Rec. - Part A Discov. Mol. Cell. Evol. Biol.* **2004**.
- 1289 60. Cohen J, Ooms MP, V.J. Reduction of fertilizing capacity of epididymal spermatozoa  
1290 by 5 alpha-steroid reductase inhibitors. *Experientia.* **1981**.
- 1291 61. Carpino A, Romeo F, R. V. Aromatase immunolocalization in human ductuli  
1292 efferentes and proximal ductus epididymis. *J Anat.* **2004**.
- 1293 62. Atanassova, N.; McKinnell, C.; Williams, K.; Turner, K.J.; Fisher, J.S.; Saunders,  
1294 P.T.K.; Millar, M.R.; Sharpe, R.M. Age-, Cell- and Region-Specific  
1295 Immunoexpression of Estrogen Receptor  $\alpha$  (But Not Estrogen Receptor  $\beta$ ) during  
1296 Postnatal Development of the Epididymis and Vas Deferens of the Rat and Disruption  
1297 of This Pattern by Neonatal Treatment with Diethylstilbestrol <sup>1</sup>. *Endocrinology* **2001**,  
1298 *142*, 874–886.
- 1299 63. Hess, R.A.; Fernandes, S.A.F.; Gomes, G.R.O.; Oliveira, C.A.; Lazari, M.F.M.; Porto,  
1300 C.S. Estrogen and its receptors in efferent ductules and epididymis. *J. Androl.* 2011.
- 1301 64. Cooke PS, Nanjappa MK, Ko C, Prins GS, H.R. Estrogens in Male Physiology. *Physiol*  
1302 *Rev.* **2017**.
- 1303 65. McLachlan, J.A. Environmental signaling: from environmental estrogens to endocrine-  
1304 disrupting chemicals and beyond. *Andrology* 2016.
- 1305 66. McLachlan, J.A.; Newbold, R.R.; Bullock, B. Reproductive tract lesions in male mice  
1306 exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Science (80-. ).* **1975**, *190*, 991.
- 1307 67. McLachlan, J. A., Newbold, R. R., Burow, M. E. and Li, S.F. From malformations to  
1308 molecular mechanisms in the male: three decades of research on endocrine disrupters.  
1309 *APMIS.* **2001**.
- 1310 68. Pinilla L, Cocconi M, Zoppi S, M.L. Effect of neonatal estrogenization on testosterone  
1311 metabolism in the prostate and in the epididymis of the rat. *J Steroid Biochem* **1989**.
- 1312 69. Cotton, L.M.; O'Bryan, M.K.; Hinton, B.T. Cellular signaling by fibroblast growth  
1313 factors (FGFs) and their receptors (FGFRs) in male reproduction. *Endocr. Rev.* 2008.

- 1314 70. Basilico, C.; Moscatelli, D. The fgf family of growth factors and oncogenes. *Adv.*  
1315 *Cancer Res.* **1992**.
- 1316 71. Hinton, B.T.; Avellar, M.C.W. *Wolffian Duct Development*; Second Edi.; Elsevier,  
1317 2018; Vol. 1; ISBN 9780128012383.

## *Capítulo II*

1 Article

# 2 Maternal Protein Restriction Modulates Angiogenesis 3 and AQP9 Expression Leading to a Delay in Postnatal 4 Epididymal Development in Rat

5 Talita de Mello Santos \*, Marília Martins Cavariani, Dhrielly Natália Pereira, Bruno César  
6 Schimming, Luiz Gustavo de Almeida Chuffa and Raquel Fantin Domeniconi

7 Department of Anatomy, Institute of Biosciences, São Paulo State University-UNESP, 18618-970, Botucatu, SP,  
8 Brazil; [marycavariani@hotmail.com](mailto:marycavariani@hotmail.com) (M.M.C.); [dhrielly.p@gmail.com](mailto:dhrielly.p@gmail.com) (D.N.P.); [bruno.schimming@unesp.br](mailto:bruno.schimming@unesp.br)  
9 (B.C.S.); [luiz-gustavo.chuffa@unesp.br](mailto:luiz-gustavo.chuffa@unesp.br) (L.G.d.A.); [raquel.domeniconi@unesp.br](mailto:raquel.domeniconi@unesp.br) (R.F.D.)

10 \* Correspondence: [talita\\_mellosantos@yahoo.com.br](mailto:talita_mellosantos@yahoo.com.br).

11 **Abstract** The maternal nutritional status is essential to the health and well-being of the fetus. Maternal  
12 protein restriction during the perinatal stage causes sperm alterations in the offspring that are  
13 associated with epididymal dysfunctions. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor,  
14 VEGFr-2, as well as aquaporins (AQPs) are important regulators of angiogenesis and the epididymal  
15 microenvironment and are associated with male fertility. We investigated the effects of maternal  
16 protein restriction on epididymal angiogenesis and AQP expression in the early stages of postnatal  
17 epididymal development. Pregnant rats were divided into two experimental groups that received  
18 either a normoprotein (17% protein) or low-protein diet (6% protein) during gestation and lactation.  
19 At postnatal day (PND)7 and PND14, male offspring were euthanized, the epididymides were  
20 subjected to morphometric and microvascular density analyses and to VEGF-A, VEGFr-2, AQP1 and  
21 AQP9 expression analyses. The maternal low-protein diet decreased AQP9 and VEGFr-2 expression,  
22 decreased epididymal microvascularity and altered the morphometric features of the epididymal  
23 epithelium; no changes in AQP1 expression were observed at the beginning of postnatal epididymal  
24 development. Maternal protein restriction alters microvascularization and affects molecules involved  
25 in the epididymal microenvironment, resulting in morphometric alterations related to a delay in the  
26 beginning of epididymis postnatal development.

27 **Keywords:** fetal programming; aqp1; aqp9; vegf; protein restriction; epididymal development;  
28

## 29 1. Introduction

30 Studies have revealed potential factors that increase the risks of diseases during the developmental  
31 period unpublished data [1–3]. These studies support the developmental origins hypothesis, which is  
32 based on the interaction between early developmental plasticity and environmental factors, and studies  
33 have been conducted to determine the mechanisms by which these factors may affect health and disease  
34 later in life [4,5]. The genome is evolutionarily and chemically very stable, so environmental factors  
35 generally do not cause genomic changes in DNA sequences. These factors may cause hereditary changes  
36 through manipulation independent of DNA sequence, thereby changing the epigenome. These  
37 alterations may be due to DNA methylation, histone acetylation, hormonal imprinting and/or growth  
38 factors and transcription alterations [6,7]. Poor-quality nutrition during the pre- and postnatal periods  
39 is an extrinsic maternal factor and has been shown to be a key factor in the development of several  
40 diseases [8–10]. In recent years, male infertility has been shown to be associated with congenital defects  
41 caused by embryonic and fetal development [11]. Epidemiological and experimental evidence has  
42 shown an association between low birth weight and male subfertility in humans [12].

43 Boeri et al. (2016) [13] observed a positive correlation between infertile adults born with a low birth  
44 weight. These adult males had alterations associated mainly with epididymal functions, such as  
45 reduced sperm motility, including asthenozoospermia (reduction or absence of sperm motility) and  
46 higher rates of teratozoospermia (alterations in sperm morphology that may lead to infertility). Of the  
47 fetal programming models for maternal nutrition, that of protein restriction in a diet offered to pregnant  
48 rats is one of the most frequently used, leading to increased risks of certain diseases or disorders later  
49 in life as cardiovascular and metabolic diseases [14,15].

50 The protein restriction diet in pregnant rats has already been shown to be able to alter maternal  
51 metabolism, increasing maternal serum corticosterone, estradiol and testosterone concentrations. In  
52 addition, other studies observed alterations in seminiferous tubule organization and in epididymal  
53 functions, similar to those found in men with low birth weight. These alterations include reductions in  
54 sperm motility, sperm concentration and viability, in addition to morphological changes [16,17].

55 In male embryos, the proximal region of the mesonephric tubules originates the mesonephric ducts  
56 or Wolffian ducts (WD) that eventually become the epididymis. During embryonic and postnatal  
57 development, these ducts elongate and acquire a coiled aspect under the influence of testosterone and  
58 growth factors; these factors regulate gene expression and epithelial-mesenchymal interactions [18–20].  
59 During postnatal development, the rat epididymis grows and expands, and the epithelial and  
60 mesenchymal cells differentiate into several cell types. This cell differentiation period consists of an  
61 undifferentiated stage between the 1<sup>st</sup> and 15<sup>th</sup> PND, followed by a differentiation phase, when the first  
62 spermatozoa are observed after the first testicular fluid wave (between the 15<sup>th</sup> and 45<sup>th</sup> PND). In brief,  
63 the arrival of these growth factors during the first stage of postnatal development occurs through the  
64 blood vessels [21].

65 The epididymis is usually divided into four regions, namely, the initial segment (IS), caput, corpus  
66 and cauda, and each region contributes in an essential way to the process of sperm maturation [22].  
67 However, the most proximal region of the epididymis, the IS, may undergo proper differentiation to  
68 ensure its function in sperm maturation, being the region of the epididymis that is critical for male  
69 fertility; the incomplete development of this region results in infertility [23].

70 Because of the relationship between capillary flow volume and the local cell metabolic rate, blood  
71 flow into the IS is higher than in any other region of the epididymis. Therefore, this segment is  
72 metabolically very active and is dependent on factors secreted directly by the testes and on circulating  
73 androgens [24]. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (VEGFR-2) are the main  
74 regulators in angiogenesis promotion and are essential for male fertility. Studies have shown an  
75 association between VEGF expression and male infertility associated with blood vessel formation.  
76 Recent evidence has indicated that these factors affect the epididymal microenvironment and sperm  
77 maturation [25].

78 Another important group of proteins related to the epididymal microenvironment is composed of  
79 the aquaporins (AQPs). AQPs are transmembrane proteins involved in fluid reabsorption/secretion  
80 dynamics, which are essential for the regulation of water homeostasis. Nine mRNAs that code for AQPs  
81 (Aqp1–3, 5–9 and 11) are present in the epididymis [26]. Among these, stand out AQP1 and AQP9 are  
82 expressed in endothelial cells and muscle cells and in principal cells, respectively. While AQP1 is  
83 present in the endothelium of vascular channels and is important for maintaining fluid equilibrium in  
84 the tissue, AQP9 is the main AQP of the epididymal epithelium, where it contributes to apical  
85 membrane permeability to water and neutral solutes. The AQP9 promoter contains a putative steroid  
86 receptor binding site and is affected by the estrogen/androgen balance. Conversely, AQP1 does not  
87 seem to be directly affected by sex hormones [27,28].

88 A recently published study by our research group showed that some impairments that appeared  
89 at puberty in animals whose mothers received a low-protein diet during gestation and lactation, such  
90 as changes in AQP1, AQP9, VEGFa and VEGFR-2 expression and in the microvasculature density  
91 (MVD) [29], were alleviated when the animals reached adulthood. Interestingly, sperm alterations,  
92 which are associated with epididymal functions, are still observed in these adult animals [16].

93 To characterize the involvement of functional alterations in the adult epididymis, it is necessary to  
 94 investigate the MVD in all epididymal regions and the expression of AQPs, VEGFa and VGFR-2 during  
 95 early postnatal epididymal development. The results may contribute new data to the field of  
 96 reproductive biology and clarify possible gaps in epididymis-related low fertility related after maternal  
 97 protein restriction.

## 98 2. Materials and Methods

### 99 2.1. Experimental Design

100 Adult female (60 days of age,  $n = 40$ ) and male (90 days of age,  $n = 20$ ) Wistar rats were obtained  
 101 from the Central Biotherium of São Paulo State University (UNESP) and housed in polypropylene cages  
 102 (43 cm × 30 cm × 15 cm) with laboratory grade pine shavings as bedding. The rats were maintained  
 103 under controlled temperature ( $22 \pm 2$  °C), relative humidity ( $55 \pm 10\%$ ) and lighting conditions (12:12-h  
 104 photoperiod). Balanced rat chow (NUVILAB® CR1 – Nuvital-PR) and filtered tap water were provided  
 105 ad libitum. The experimental protocol was designed following Brazilian laws and was approved by the  
 106 Ethical Committee on Animal Use from the Institute of Biosciences of Botucatu (CEUA: protocol n° 797).

107 Two female rats were mated with one male during the dark period of the light/dark cycle, and the  
 108 following day, vaginal smears were performed. The day of detection of the sperm in the vaginal smear  
 109 was considered gestational day 0 (GD 0). Pregnant females were randomly allocated into 2 experimental  
 110 groups: The normoprotein group (NP,  $n = 19$ ) and the low-protein group (LP,  $n = 19$ ). The NP pregnant  
 111 females were fed a normoprotein diet (17% protein) ad libitum, and the LP pregnant females were fed  
 112 a low-protein diet (6% protein) ad libitum. Both groups received the diet over the entire gestational and  
 113 lactation periods (Table 1).

114 **Table 1.** Composition of the food provided to the animals during the gestation and lactation periods.

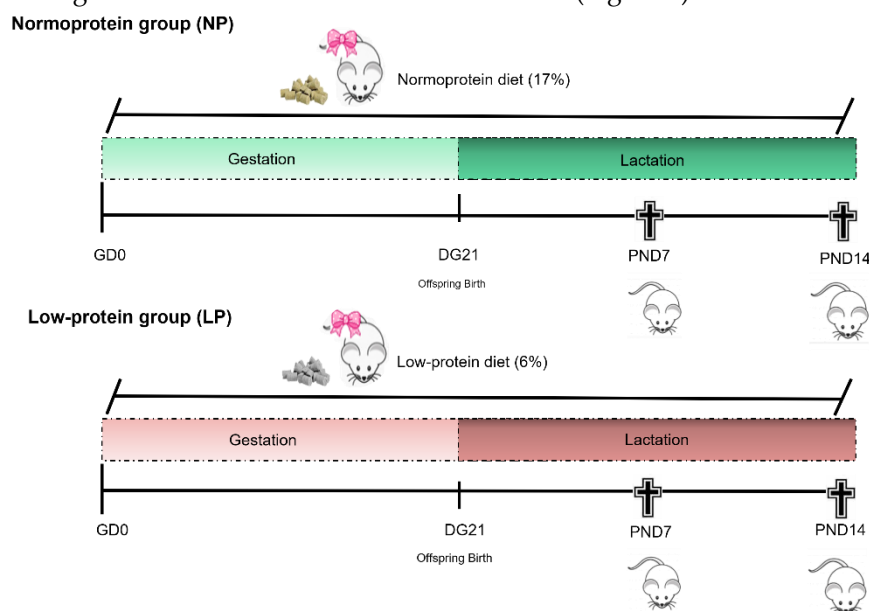
Components*	Normoprotein (17% protein)	Low-protein (6% protein)
Casein (84% of protein)**	202.00	71.50
Corn flour	397.00	480.00
Dextrin	130.50	159.00
Sucrose	100.00	121.00
Soy oil	70.00	70.00
Fiber (microcellulose)	50.00	50.00
Mineral blend ***	35.00	35.00
Vitamin blend ***	10.00	10.00
L – cystine	3.00	1.00
Choline chloride	2.50	2.50

115 \* Diet for rodent during gestation- AIN-93G. \*\* Values corrected according to casein. \*\*\* Following AIN-93G.

116 The pregnant females were housed in individual cages and weighed every week to monitor weight  
 117 gain. During the entire gestation period until PND14, the total food consumed was monitored weekly,  
 118 and the values obtained were divided by seven to estimate the daily consumption of each animal in  
 119 both groups.

120 After birth, the litter size was standardized to eight pups per mother in both experimental groups  
 121 to ensure the equality of the weaning to all offspring. The pups remained with the mothers in individual  
 122 boxes until the moment of euthanasia at PND7 (NP = 17 pups/group; LP = 19 pups/group) or PND14  
 123 (NP = 19 pups/group; LP = 26 pups/group) and had their body weights and lengths measured before  
 124 euthanasia. After the pups were anesthetized with ketamine and xylazine, they were killed by

125 decapitation, and the epididymides were collected. After being weighed, the left epididymides were  
 126 immediately packed in cryotubes, frozen in liquid nitrogen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The right epididymides  
 127 were collected, dissected and fixed in 10% buffered formalin (0.1 M phosphate buffer pH 7.3) for 24 h,  
 128 washed in running water for 24 h and stored in 70% alcohol (Figure 1).



129

130

**Figure 1.** Illustration of the experimental design.

## 131 2.2. Western Blot

132 Total epididymides were used to perform western blotting. Due to the small size and weight of the  
 133 epididymis, pools were used with 4–5 animals/pool for a total of 5 samples/group for animals at P7, and  
 134 2–3 animals/pool for a total of 5 samples/group for animals at P14. The samples were homogenized at  
 135  $4^{\circ}\text{C}$  in RIPA buffer (BioRad®, USA) with protease inhibitor (Sigma-Aldrich®, USA) with a Tureaux-type  
 136 homogenizer for 3 5-second cycles. The homogenate was centrifuged at 15,000 rpm for 20 min at  $4^{\circ}\text{C}$ ,  
 137 and the supernatant was collected. The protein quantification was performed as described by Bradford  
 138 [30] in ELISA plates with 96 wells and read in an ELISA reader (595 nm). Aliquots (70  $\mu\text{g}$  protein) were  
 139 treated with buffer solution (Laemli Sample Buffer-BioRad®) and  $\beta$ -mercaptoethanol at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min.  
 140 Then, the proteins were separated by vertical SDS-PAGE (Mini-Protean, BioRad®). After  
 141 electrophoresis, proteins were transferred to a nitrocellulose membrane in a wet transfer system.  
 142 Nonspecific protein binding was blocked with 3% skim milk in TBST buffer for 1 h at room temperature.  
 143 Then, the membranes were incubated overnight with the following primary antibodies diluted in TBST:  
 144 AQP1 (concentration 1:800; AB2219 EMD-Millipore Corp., Billerica, Ma, USA); AQP9 (concentration  
 145 1:500, APQ91-A Alpha Diagnostic, San Antonio, TX, USA); VEGFa (concentration 1:1000, SC-152 Santa  
 146 Cruz, CA, USA); VEGFr-2 (concentration 1:1000, SC-6251 Santa Cruz, CA, USA); and  $\beta$ -actin  
 147 (concentration 1:800; ab-8227 Abcam Inc., Cambridge, Ma, USA). Subsequently, the membranes were  
 148 washed for three times for 10 min each in TBST and incubated for 2 h with the following specific HRP  
 149 secondary antibodies diluted in TBST: IgG goat-anti rabbit for AQP1, AQP9 (concentration 1:5000,  
 150 Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo, USA) and VEGFa (concentration 1:2000, Sigma-Aldrich Co., St.  
 151 Louis, Mo, USA); IgG goat-anti mouse for VEGFr-2 (concentration 1:5000, Sigma-Aldrich Co., St. Louis,  
 152 Mo, USA); and IgG rabbit-anti goat for  $\beta$ -actin (concentration 1:6000, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Mo,  
 153 USA). The membranes were then washed three times for 10 min each with TBST. Immunoreactive  
 154 components were visualized with a chemiluminescence kit (Amersham™ ELC Select™ Western  
 155 Blotting Detection Reagent, GE Healthcare®, UK), and the optical density of each band was measured  
 156 by ImageJ® Windows® software, normalized to  $\beta$ -actin.





### 157 2.3. Morphometrical Analysis

158 The epididymides fixed in 10% buffered formalin were cleared in xylene and then embedded in  
 159 Paraplast. Serial 4- $\mu$ m sections were obtained with an automatic microtome and added to silanized  
 160 slides. Histological sections of tissue from animals in different litters ( $n = 4$ ) were stained with  
 161 hematoxylin and eosin (HE) and scanned using a 3D Hitech Panoramic MIDI. Thereafter, tissues were  
 162 analyzed and photographed, and the luminal and tubular diameter and the epithelium length from the  
 163 IS, caput, corpus and cauda were measured using the Panoramic Viewer program.

### 164 2.4. Immunohistochemistry at PND 14

165 Epididymal sections from the LP and NP animals (sections of animals from different litters;  $n = 4$   
 166 animals/group) were subjected to antigen retrieval in a humid environment (electric pot) at 100 °C in  
 167 Tris/0.1 M EDTA pH 9.0 for 30 min. After being washed in distilled water, the sections were subjected  
 168 to the blocking of endogenous peroxidase (3% hydrogen peroxide in methanol) for 15 min. To block  
 169 nonspecific binding, the slides were incubated with 3% skim milk in PBS for 1 h. Then, the sections were  
 170 incubated overnight (at 4 °C) with primary antibodies to AQP1 (concentration 1:200; AB2219 EMD-  
 171 Millipore Corp.<sup>®</sup>, Billerica, Ma, USA) or AQP9 (concentration 1:200, APQ91-A Alpha Diagnostic, San  
 172 Antonio, TX, USA), which were diluted in 1% BSA. After incubation with the primary antibodies, the  
 173 sections were washed in PBS and then incubated with anti-rabbit secondary HRP antibody (ab97051;  
 174 concentration 1:200, Abcam Inc.<sup>®</sup>, Cambridge, Ma, USA) for 2 h at room temperature. The reaction was  
 175 visualized with DAB chromogen (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Sigma-Aldrich Co.<sup>®</sup>, St.  
 176 Louis, Mo, USA) and counterstained with hematoxylin for 1 min. The slides were scanned using a 3D  
 177 Hitech Panoramic MIDI and analyzed and photographed using the Panoramic Viewer program.

### 178 2.5. Microvascular Density (MVD) Determination at PND14

179 The MDV was determined per the procedures described by Cavariani et al., 2019 [29]. Epididymal  
 180 sections from LP and NP animals ( $n = 4$  animals/group) that had been immunostained with anti-AQP1  
 181 were evaluated by stereological analysis to estimate the number of microvessels in the IS, caput, corpus  
 182 and cauda epididymis. Data are presented as the percentage of microvessels per total stromal area  
 183 analyzed.

### 184 2.6. Statistical Analysis

185 T-tests for parametric data and the Mann–Whitney test for nonparametric data were performed.  
 186 The data were compared among experimental groups using GraphPad Prism<sup>®</sup> software (version 5.00).  
 187 Differences were considered significant when  $p \leq 0.05$ . Data are presented as the mean  $\pm$  standard error  
 188 of the mean (SEM).

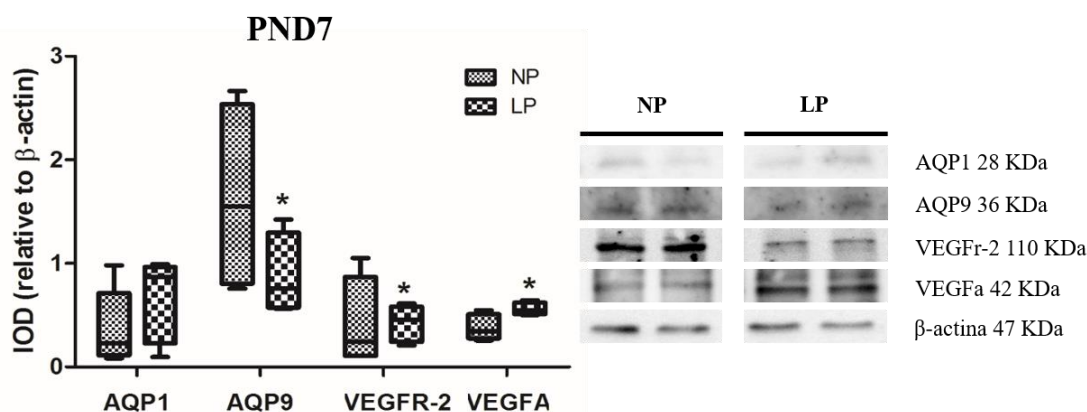
## 189 3. Results

### 190 3.1. A Maternal Low-Protein Diet Alters the Protein Levels of VEGFr-2 and VEGFa in the Epididymis of the 191 Offspring in the First Postnatal Week

192 The levels of VEGFa were increased (fold-change 1.47) and those of VEGFr-2 were decreased (fold-  
 193 change 0.95) in LP animals compared with NP animals at PND7 (Figure 2). However, the levels of  
 194 VEGFa and VEGFr-2 did not change significantly at PND14 (fold-change increase of 1.03 and decrease  
 195 of 0.85, respectively) (Figure 3).

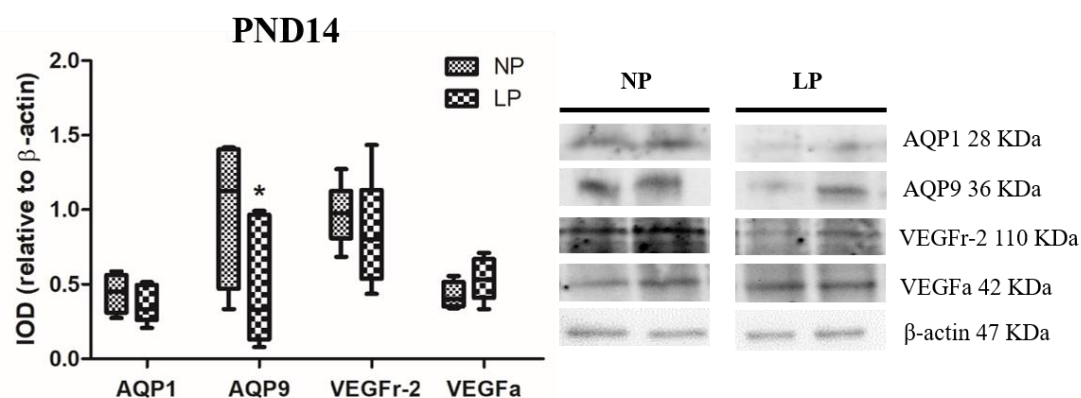
### 196 3.2. A maternal Low-Protein Diet Alters the Protein Levels of AQP9 but Not of AQP1 in the Epididymis of the 197 Offspring at PND7 and PND14

198 The animals whose mothers were subjected to protein restriction during gestation and lactation  
 199 presented a reduction in the protein levels of AQP9 at PND7 (fold-change 0.54) and PND14 (fold-change  
 200 0.33), but no change was observed for AQP1 in the epididymis at any age studied (fold-change PND7  
 201 1.73 and PND14 1.07) (Figure 2 and 3).



202  
203

204 **Figure 2.** Expression of AQP1, AQP9, VEGFr-2 and VEGFa in the epididymis of NP and LP animals at  
 205 PND7. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. \*  $p < 0.05$ . Mann–Whitney test.



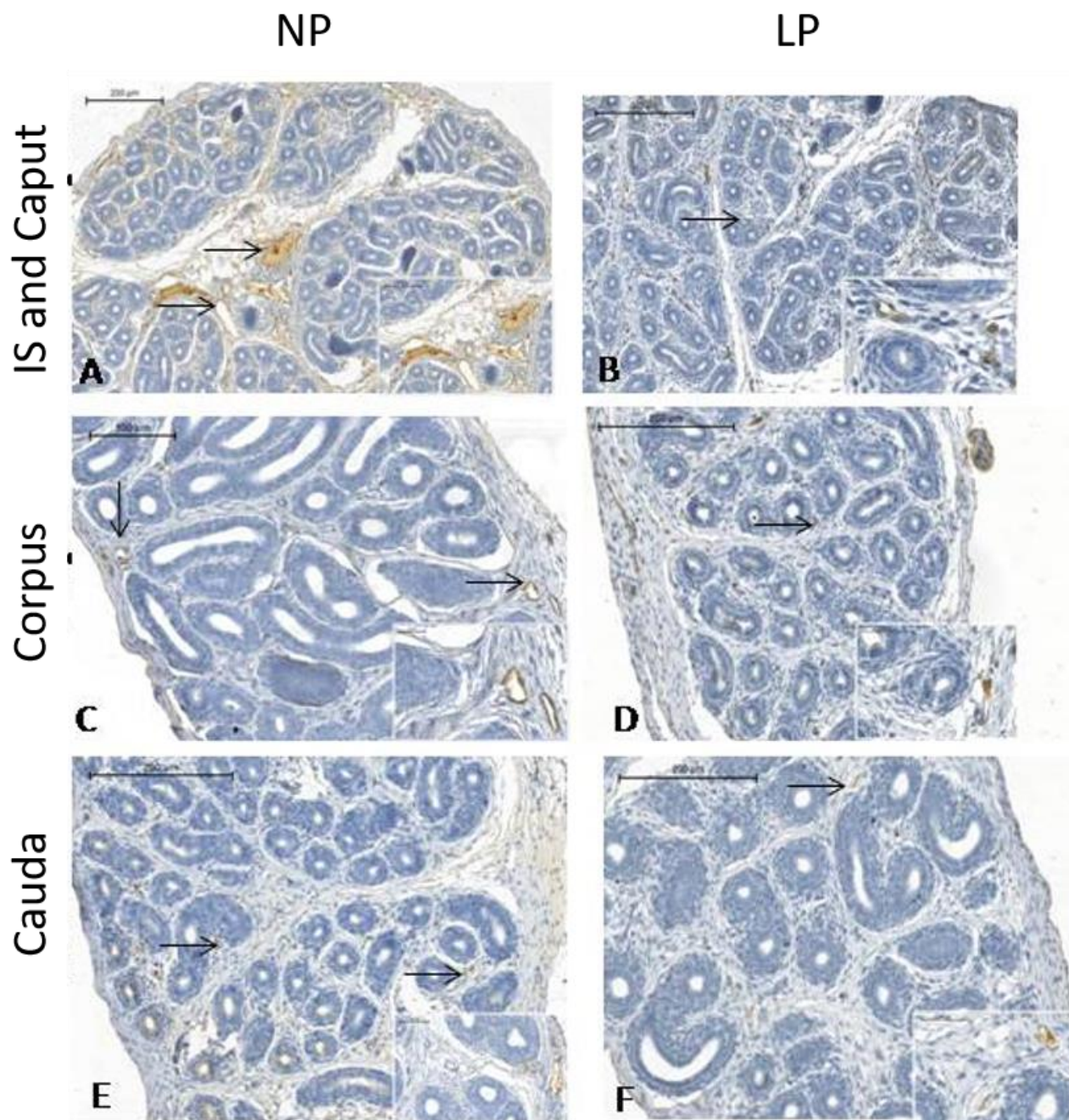
206

207 **Figure 3.** Expression of AQP1, AQP9, VEGFr-2 and VEGFa in the epididymis of NP and LP animals at  
 208 PND14. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. \*  $p < 0.05$ . Mann–Whitney test.

### 209 3.3. A Maternal Low-Protein Diet Promotes Changes in the Immunostaining Pattern of AQP9 but Not of 210 AQP1 in the Offspring at PND14

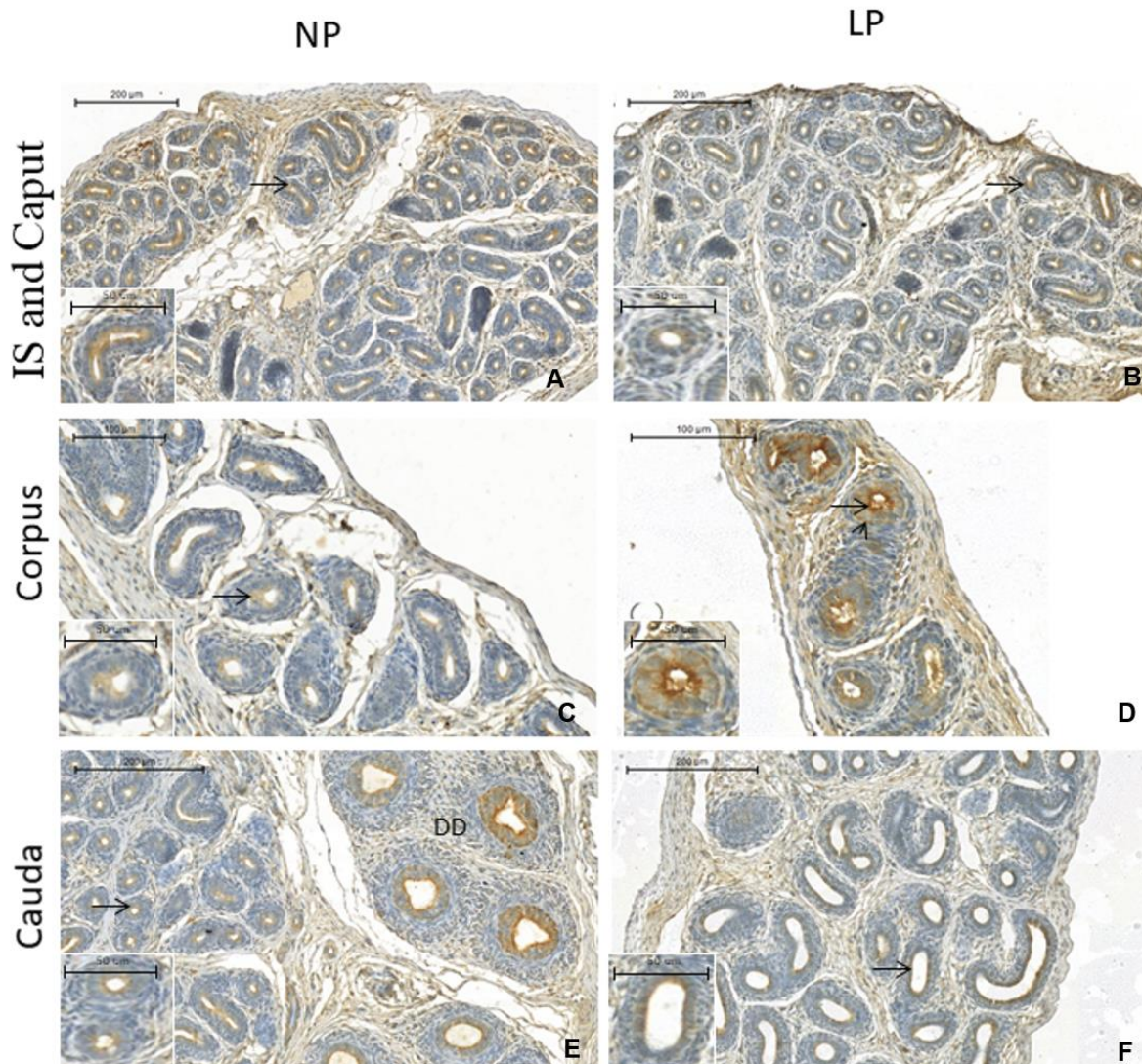
211 This study is the first to demonstrate AQP1 and AQP9 positive staining in the epididymis of rats  
 212 aged only 14 days (Figure 4 and 5, respectively). The youngest age of rats examined to date was PND  
 213 21, which was recently reported by our research group [29]. Interestingly, the immunolocalization  
 214 pattern of AQP1 was the same as that described by Cavariani et al., 2019 [29]. AQP1 staining appeared  
 215 in the endothelial cells of vascular channels throughout the epididymis in both the NP and LP groups,  
 216 but staining was not observed in the peritubular cells that surrounded the duct, probably because the  
 217 mesenchymal cells were not differentiated into muscle cells yet. No differences were observed between  
 218 the NP and LP groups. However, we noticed a lower number of vessels in the LP group than in the NP  
 219 group in all regions, but mainly in the IS region (Figure 4B); this was the most vascularized epididymis  
 220 region compared to the same region in the NP animals (Figure 4A). We could also verify that the blood  
 221 vessels of the diet-restricted animals had a smaller diameter, showing that the development of these  
 222 vessels was delayed (Figure 4). AQP9 immunolocalization showed discontinuous immunostaining in

223 different regions of the epididymis, with AQP9 being positively localized to the apical region of the  
 224 epithelial cells (Figure 5D). In the region of the IS (Figure 5A and B), in both the NP and LP groups,  
 225 there was stronger staining than in the adjacent (caput) region. However, this staining was more intense  
 226 in the IS of the NP group than in the IS of the LP group. In the epididymal corpus of the LP animals  
 227 (Figure 5D), the intensity of AQP9 staining was stronger than that in the NP group (Figure 5C). In the  
 228 caput region (Figure 5E and F), there was discontinuous immunostaining of AQP9 in the tubular  
 229 epithelium of both groups, with staining being more prevalent in the transition region of the vas  
 230 deferens.



231  
 232  
 233  
 234

**Figure 4.** Epididymis sections of the initial segment (IS), caput regions, corpus and cauda from the NP and LP animals at PND14 subjected to AQP1 immunostaining. NP = normoprotein animals; LP = low-protein animals. Arrow = Positive staining for AQP1 in the vascular endothelium.



235

236

237

238

**Figure 5.** Epididymis sections of the initial segment (IS), caput regions, corpus and cauda from the NP and LP animals at PND14 subjected to AQP9 immunostaining. NP = normoprotein animals; LP = low-protein animals. Arrow = Positive staining for AQP9.

239

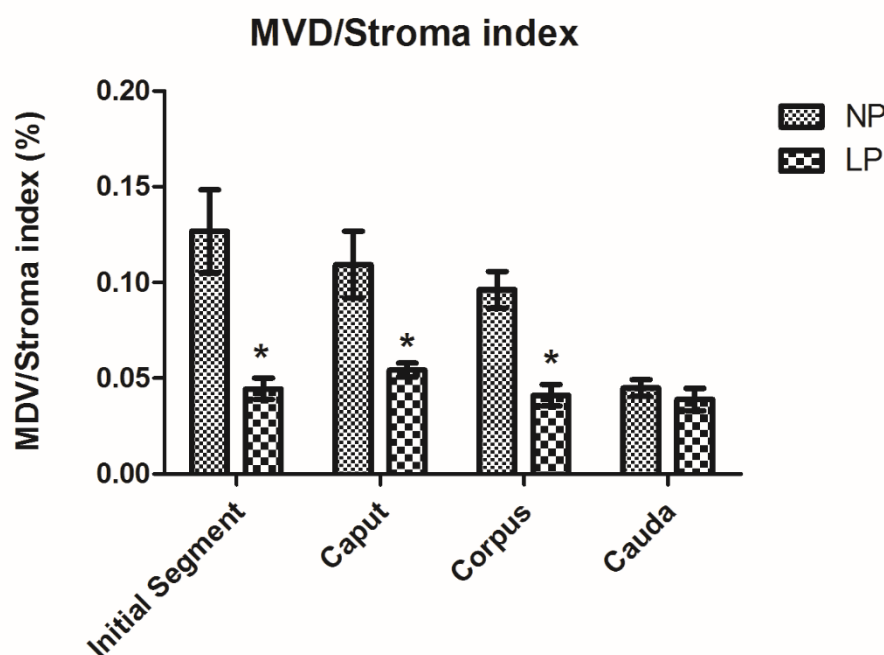
### 3.4. A Maternal Low-Protein Diet Decreases the Microvascular Density (MVD) of the Offspring at PND14.

240

241

242

The MVD/stroma index was used to analyze the epididymis microvasculature. These values showed a decrease in the blood supply of the IS, caput and corpus, but not in the cauda at PND14 in the LP animals compared to the NP group (Figure 6).



243

244

245

**Figure 6.** The microvascular densities in the epididymis of the NP and LP animals at PND14. Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. \*  $p < 0.05$ . Mann–Whitney test.

246

247

### 3.5. A Maternal Low-Protein Diet Changes the Epididymal Morphometry of the Offspring but Not the Morphology

248

249

250

251

252

253

254

255

The 7-day-old LP epididymis showed a decrease in tubular diameter in the IS, caput and corpus, but not in the cauda; the luminal diameter was decreased only in the IS (Table 2). The epithelial height was decreased in the IS and corpus, and at PND14, the tubular diameter was decreased in the epididymis corpus of the LP animals but not in that of the NP animals (Table 3). A normal epididymal structure was observed in both groups at PND7 and PND14. The epididymal ducts were lined by a columnar epithelium resting on a basal lamina. A few halo cells were found among the columnar cells. The epididymal ducts were surrounded by a thin layer of mesenchymal cells that had not differentiated into smooth muscle (supplementary material).

256

**Table 2.** Epididymal morphometry at PND7.

Parameters ( $\mu\text{m}$ )	PND7							
	IS		Caput		Corpus		Cauda	
	NP	LP	NP	LP	NP	LP	NP	LP
Tubular diameter	23.87 $\pm$ 0.37	21.86 $\pm$ 0.43 *	25.90 $\pm$ 0.57	23.33 $\pm$ 0.27*	27.97 $\pm$ 0.25	25.58 $\pm$ 0.82 *	35.85 $\pm$ 1.45	32.33 $\pm$ 2.53
Epithelial height	7.73 $\pm$ 0.22	7.22 $\pm$ 0.06	7.15 $\pm$ 0.29	6.78 $\pm$ 0.18	7.78 $\pm$ 0.01	7.268 $\pm$ 0.07	8.579 $\pm$ 0.83	7.14 $\pm$ 0.43
Luminal diameter	7.49 $\pm$ 0.15	6.70 $\pm$ 0.18 *	10.97 $\pm$ 0.51	9.29 $\pm$ 0.68	12.10 $\pm$ 0.34	10.60 $\pm$ 1.27	19.23 $\pm$ 0.45	18.01 $\pm$ 3.11

257

NP N=4 and LP N=4; Data expressed as the mean  $\pm$  S.E.M.. \*  $p < 0.05$ . T-test

258

259

260

Table 3. Epididymal morphometry at PND14.

Parameters ( $\mu\text{m}$ )	PND14							
	IS				IS			
	NP	LP	NP	LP	NP	LP	NP	LP
Tubular diameter	28.47 $\pm$ 0.80	25.80 $\pm$ 1.30	33.55 $\pm$ 2.24	29.41 $\pm$ 1.26	40.18 $\pm$ 1.05	32.46 $\pm$ 1.04 *	39.82 $\pm$ 2.17	38.29 $\pm$ 1.97
Epithelial height	9.50 $\pm$ 0.28	8.17 $\pm$ 0.39 *	8.90 $\pm$ 0.99	7.47 $\pm$ 0.60	11.85 $\pm$ 0.28	9.17 $\pm$ 0.67 *	10.93 $\pm$ 1.72	8.07 $\pm$ 0.23
Luminal diameter	9.22 $\pm$ 0.62	8.56 $\pm$ 0.51	14.16 $\pm$ 1.51	14.18 $\pm$ 0.81	15.06 $\pm$ 0.62	14.52 $\pm$ 0.73	19.02 $\pm$ 1.86	21.99 $\pm$ 2.32

261

NPN = 4 and LP N = 4; Data expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. \*  $p < 0.05$ . T-test.

262

#### 4. Discussion

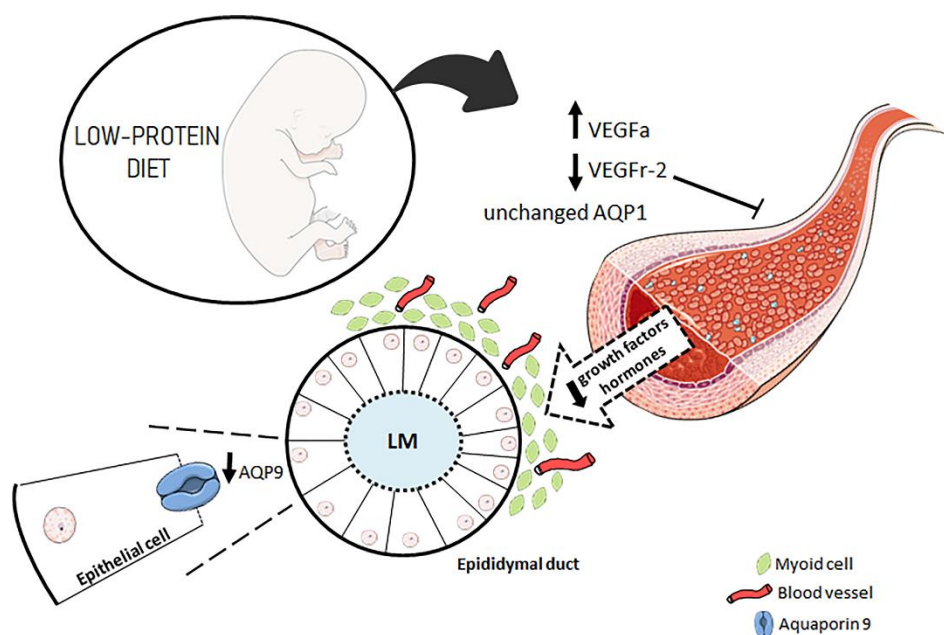
263

264

265

266

In the present study, we showed that a maternal low-protein diet during gestation and lactation was able to decrease AQP9 and VEGFr-2 expression while enhancing VEGFa expression, changing the patterns of epididymal microvasculature and altering the features of the epididymal epithelium (Figure 7).



267

268

269

270

271

272

273

274

275

276

277

**Figure 7.** Representative image that illustrates the impact of maternal protein restriction in the early stage of postnatal epididymal development in rat. Maternal protein restriction decreases microvascular density by decreasing the VEGFr-2 expression in the endothelial cells. With the decrease in the number of vessels, the arrival of growth factors and hormones, including androgens, also decreases. Blood vessels are present around the mesenchymal cells that surround the epithelium, and before the first wave of testicular fluid, the arrival of hormones occurs exclusively through blood supply. When differentiated, the principal cells begin to express AQP9 in the apical region. Because AQP9 is downregulated in these cells, the luminal microenvironment may not be adequately regulated. AQP9 = aquaporin 9; AQP1 = aquaporin 1; VEGFa = vascular endothelial growth factor; VEGFr-2 = vascular endothelial growth factor receptor type 2, LM: luminal microenvironment.

278

279

280

281

282

According to the developmental origins of health and diseases (DOHaD) hypothesis, the high plasticity of the fetal organism is conditioned by an adaptive response that can modify the individual phenotype. The interactions between intrinsic factors, such as genetics and epigenetics, and extrinsic maternal factors, such as maternal nutrition, can influence these developmental processes and lead to permanent changes in adulthood [31–33].



283 During postnatal development, the epididymal duct elongates and coils, and the connective tissue  
284 septa start to divide the epididymis into different segments [21]. At the same time, the epididymal  
285 vasculature grows to follow the development of the epididymal duct and ensure vascularization of the  
286 expanding organ [34].

287 VEGFa is an important growth factor associated with the reproductive system and acts through  
288 VEGFr-2 to promote angiogenesis; VEGFa and VEGFr-2 are mostly expressed in the initial segment  
289 [24,35]. Both VEGFa and VEGFr-2 are specific endothelial cell factors that participate in sperm  
290 maturation through their important roles in maintaining the epididymal microenvironment and  
291 promoting cell proliferation, migration and tube formation in normal epididymal tissues [25,36].

292 Although the VEGFr-2 and VEGFa levels were unchanged in LP animals at PND14, we observed  
293 a decrease in VEGFr-2 expression in the diet-restricted animals at PND7. This result could be associated  
294 with a decrease in microvascular density (MVD), especially in the initial segment that was observed in  
295 the same group at PND14. Thus, a maternal low-protein diet was able to alter the epididymal vascular  
296 pattern during an important period of the postnatal development of this organ.

297 Maternal protein malnutrition has already been shown to be associated with an impairment in  
298 angiogenesis with decreased VEGFr-2 expression in the prostate. Previous work has shown that  
299 maternal protein malnutrition leads to a decrease in VEGFr-2 expression in the prostate, which  
300 compromises the angiogenesis process. This result was associated with a delay in prostate development  
301 at PND10 and PND21 in rat offspring from mothers receiving a protein-restricted diet during gestation  
302 and lactation [37].

303 During the early postnatal period, an adequate blood supply is crucial to promote the transport of  
304 hormones, metabolites and nutrients required by the epididymis to maintain its normal development  
305 [38]. A reduction in MVD can lead to ineffective diffusion of hormones, growth factors and oxygen,  
306 resulting in altered production of stimulatory molecules related to cellular differentiation and  
307 morphogenesis, leading to permanent effects in adulthood [37]. Recently, we showed that maternal  
308 protein restriction resulted in a low MVD in all epididymal regions at the prepubertal stage. However,  
309 this decreased pattern of vascularization did not remain in adulthood, and MVD was restored in LP  
310 animals, maintaining their MVD values to the levels of those found in the NP group at PND120 [29].

311 VEGFa is required for the formation of blood vessels during fetal development, while in adults,  
312 VEGFa is necessary to maintain the regular function of blood vessels. The increase in VEGFa expression  
313 during epididymal development is important to promote vascular permeability and provide a blood  
314 supply due to the absence of neovascularization in this organ during adulthood [39]. We hypothesized  
315 that the recovery of MVD in adulthood may be associated with the increase in VEGFa expression  
316 observed in LP animals at the beginning of epididymal development (PND7), as this growth factor acts  
317 as a paracrine effector that regulates the division of blood vessel cells in an attempt to stimulate  
318 neovascularization in the epididymis of restrict animals.

319 In addition to VEGF, AQPs are also involved in angiogenesis. Mainly through water homeostasis,  
320 AQPs are essential regulators of epididymal function, contributing to membrane fluidity and structural  
321 integrity [28,40,41]. Recent evidence indicates that AQPs are involved in cell migration, proliferation,  
322 carcinogenesis and physiologic inflammatory processes [42]. Several studies have associated different  
323 diseases with changes in AQP mRNA and protein expression. It has been suggested that AQP1 is  
324 involved in lung cancer differentiation [43] and in the pathophysiology of inflammatory bowel disease  
325 [44]. AQP9 is associated with ovarian cancer [45] and hepatocellular carcinoma [46], in addition to  
326 inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis [47] and, more recently, endometriosis [48].

327 In the epididymis, AQP9 is responsible for removing fluid from the epididymal lumen, while  
328 AQP1 removes fluid from the epididymis to the blood vessels, both of which play a crucial role in the  
329 secretion/reabsorption dynamics during sperm transport and maturation [49].

330 AQP1 is a water-selective channel that is permeable to water but not to small organic and inorganic  
331 ions/molecules [50]. It is an important structural protein present in the endothelial cells of blood vessels  
332 and, in adult rats, is also found in the smooth muscle cells that surround the epididymal duct [27,51,52].

333 There are no previous studies showing immunostaining for AQP1 in the epididymis of young rats due  
334 to the absence of this protein in the early developmental stages of this organ. Thus, we were not able to  
335 observe AQP1 labeling in the 7-day-old animals. However, it is important to reinforce that this is the  
336 first study to show AQP1 immunostaining at PND14.

337 At PND14, AQP1 immunolocalization was observed in the endothelial cells of vascular channels  
338 in both the NP and LP animals, as described in 21-day-old rats [29]. The staining was not found in the  
339 smooth muscle cells, as was observed in the adult epididymis, probably because the mesenchymal cells  
340 are not differentiated into muscle cells due to a period of no differentiation [26,29]. There was no  
341 difference in the immunostaining of this protein between the experimental groups in any of the  
342 epididymal regions. However, we observed a higher number of AQP1-positive vessels in the NP group,  
343 mainly in the IS, than in the LP group. This was confirmed by the MVD analyses. Moreover, we  
344 observed that the diameter of the vessels was smaller in this diet-restricted group, showing a delay in  
345 vessel development. However, more in-depth studies that specifically evaluate angiogenesis are  
346 necessary.

347 Maternal protein restriction causes a delay in prostate morphogenesis in male rats at PND10 and  
348 PND21 that is associated with a reduced angiogenic process through downregulation of the AQP1 and  
349 VEGF signaling pathways [37]. However, our data showed that this low-protein fetal programming did  
350 not change AQP1 levels at the beginning of epididymis postnatal development. It is likely that the  
351 maintenance of the AQP1 levels in the LP group, similar to the NP group, is a possible mechanism to  
352 preserve vascular epididymal permeability despite the decrease in the MVD.

353 AQP9 is considered an aquaglyceroporin due to its permeability characteristics that allow the  
354 passage of a wide range of structurally unrelated molecules, including urea, glycerol, mannitol, sorbitol  
355 and water [53]. In the epididymis, this protein is the main AQP that contributes to organ permeability  
356 and is located in the stereocilia of epididymal principal cells [26,28,54].

357 Studies have shown that AQP9 mRNA levels can be found between birth and the 3rd week during  
358 postnatal epididymal development in rats. However, only after the first 4th postnatal week did AQP9  
359 protein expression begin to increase significantly, becoming abundant in adulthood [27,55].

360 As mentioned for AQP1, this is the first study to examine the immunolocalization of AQP9 at  
361 PND14. AQP9 staining was observed in epididymal epithelial cells that began differentiation into  
362 principal cells. Apparently, this staining was weaker at PND14 than that observed in adult rats [28,29].  
363 In addition, comparing both experimental groups, we observed weak staining in principal cells in LP  
364 animals, mainly in the proximal epididymal region.

365 Despite the absence of AQP9 immunolabeling at PND7, we were able to observe the expression of  
366 this protein at both ages due to its sensitivity. Our results showed that a maternal low-protein diet  
367 promoted a decrease in AQP9 levels in LP animals at both PND7 and PND14. We recently reported that  
368 maternal protein restriction decreases AQP9 expression in the IS and caput epididymis regions in  
369 prepuberal rat offspring (PND44) [29]. Corroborating these findings, Arrighi et al. (2010) [52] showed a  
370 reduction in AQP9 expression in the epididymis of adult rats subjected to malnutrition during perinatal  
371 life, and both studies associated these results with a reduction in testosterone levels.

372 AQP9 expression is mostly modulated by dihydrotestosterone (DHT), the main metabolite of  
373 testosterone, which is abundantly present in the testicular fluid that arrives to the epididymis through  
374 efferent ducts [55]. However, before the first wave of testicular fluid, at PND15, the increase in AQP9  
375 mRNA expression and protein levels may have different mechanisms of regulation [56]. Data from our  
376 research group showed that maternal protein restriction reduced testosterone conversion to DHT by  
377  $5\alpha$ -reductase actions on these same postnatal days (7 and 14) (unpublished data).

378 We suggest that the lower expression of AQP9 observed in LP animals on PND7 and PND14 could  
379 be related to the decrease in the MVD index since there was a reduction in the bloody supply that arrives  
380 to the epididymis as well as in testosterone. In addition, less testosterone would be converted into DHT  
381 due to the lower expression of  $5\alpha$ -reductase (unpublished data). At the beginning of epididymis  
382 postnatal development, this may lead to a permanent effect on fluid reabsorption, mainly in the initial



383 segment and the caput epididymis; this could promote changes in the epithelial structure, thus  
384 compromising epididymal functionality in adulthood. The imbalance in AQP9 expression can change  
385 the water absorption mechanism and consequently alter the epididymal microenvironment [53,55],  
386 representing one of the factors that contribute to changes in sperm quality already found in adults  
387 subjected to this experimental model [16].

388 Although there are few studies on the subject, it is known that male rat offspring from mothers fed  
389 a low-protein diet during pregnancy had alteration on sperm quality (~50% has shown a decrease in  
390 fertility rate compared to controls) [57]. It is well established that the combined secretory and absorptive  
391 activities of the epididymal epithelial cells are responsible for the creation of the specialized luminal  
392 microenvironment that promotes the fertility in the sperm population [58]. The presence of AQPs,  
393 channel proteins that facilitate rapid passive movement of water across cell membranes, is of major  
394 importance in the male genital ducts, as the epididymis, where water movements mainly take place  
395 [59]. Despite homozygous AQP9<sup>-/-</sup> knockout mice was demonstrated to be fertile with normal sperm  
396 motility and morphology [60], other studies have shown that alterations in the expression, function and  
397 regulation of AQPs and its interaction with other proteins, could be the basis of some types of male  
398 subfertility. In this sense, research has shown that AQP9 is responsible to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> diffusion in the luminal  
399 microenvironment and the analysis of functional sperm parameters showed that H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment  
400 reduces the vitality and progressive motility of sperm [61,62]. Another example of AQP interactions  
401 was showed in initial segment-specific Pten knockout mouse. PTEN is responsible to regulate a broad  
402 range of transporters in many organs and cell types responsible for the formation and regulation of the  
403 epididymal luminal microenvironment, as ion and water transporters including Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase  
404 subunits and AQP9. The loss of Pten changed the transporter activity resulting in alteration of the  
405 luminal fluid microenvironment that possibly lead to male infertility [63].

406 A normal epididymal structure was observed in both groups at PND7 and PND14. However, there  
407 was a significant decrease in the mean values of the epididymal duct and luminal diameters, whereas  
408 the epithelium was thicker in LP animals, mainly in the IS, caput and corpus regions. An association  
409 between decreased plasma testosterone levels and changes in the diameter of the epididymis has been  
410 shown. Therefore, androgen deprivation over time can be related to a decreased MVD index and lower  
411 blood supply, possibly resulting in a reduction in the epididymal tubule diameter in all epididymal  
412 segments and a decrease in the height of epithelial cells in the IS and caput of adult rats [64].

413 Our data support the hypothesis that a low-protein diet during gestation and lactation alters  
414 VEGFa, VEGFr-2 and AQP9 expression, as well as the epididymal microvascular density, leading to  
415 impairment in the epididymal postnatal development of the offspring.

416 It is not still clear which are the mechanisms and molecules pathways essential for epididymis  
417 function that are affected by maternal protein restriction. Our study shows changes in the levels of some  
418 proteins involved in epididymal intraluminal environment and suggest that this may be one of the  
419 factors responsible for the change in sperm quality previously described by other authors [16,57,65].  
420 Thus, it seems interesting to repeat this experimental protocol, to investigate molecules involved in the  
421 epididymal luminal environment formation and maintenance during postnatal development, and  
422 proteins secreted into the epididymal luminal environment, in addition to the molecules known to  
423 create the epididymal luminal microenvironment, e.g., ATPase, apolipoprotein, Ros-1. Finally, the  
424 possibility of monitoring the possible effects on successive generations could add important and useful  
425 information to understand other topics of the fetal programming theories.

## 426 5. Conclusion

427 Maternal protein restriction changes epididymal morphogenesis during the onset of postnatal  
428 development. These changes are associated with an impaired bloody supply and alterations in the  
429 expression of proteins required for angiogenesis and for the correct formation and maintenance of the  
430 epididymal microenvironment. Thus, our data suggest that these alterations during the early stages of



431 epididymal development may be related to changes in sperm quality, which were already reported in  
432 adult animals.

433 **Acknowledgments:** The authors would like to acknowledge to Gelson Rodriguez from Department of Anatomy,  
434 Institute of Biosciences/UNESP, Botucatu-SP, for the excellent technical support.

435 **Supplementary material:** Supplementary materials can be found at

436 **Author contributions:** T.d.M.S, M.M.C., D.N.P., R.F.D. and L.G.d.A.C participated actively in the elaboration of  
437 the main idea of the study; collected, analyzed and interpreted the data; and wrote the manuscript. B.C.S  
438 contributed with the experimental design and analysis and interpretation of the data. All authors critically  
439 reviewed the paper and approved its final version.

440 **Funding:** This research was funded by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), grants  
441 number 2016/04085-9; 2015/18767-1 and 2017/23953-4 and by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal  
442 de Nível Superior), grants number 0708/2018.

443 **Conflicts of interest:** The authors declare no conflicts of interest.

#### 444 References

- 445 1. Kumaran, K.; Osmond, C.; Fall, C.H.D. Early Origins of Cardiometabolic Disease. In *Disease Control*  
446 *Priorities, Third Edition (Volume 5): Cardiovascular, Respiratory, and Related Disorders*; 2017.
- 447 2. Lubinsky, M. An epigenetic association of malformations, adverse reproductive outcomes, and fetal  
448 origins hypothesis related effects. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2018.
- 449 3. Heindel, J.J. The developmental basis of disease: Update on environmental exposures and animal models.  
450 *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2018.
- 451 4. Bateson, P.; Barker, D.; Clutton-Brock, T.; Deb, D.; D'Udine, B.; Foley, R.A.; Gluckman, P.; Godfrey, K.;  
452 Kirkwood, T.; Lahr, M.M.; et al. Developmental plasticity and human health. *Nature* **2004**.
- 453 5. Barker, D.J.P. The origins of the developmental origins theory. In *Proceedings of the Journal of Internal*  
454 *Medicine*; 2007.
- 455 6. Skinner, M.K.; Manikkam, M.; Guerrero-Bosagna, C. Epigenetic transgenerational actions of  
456 environmental factors in disease etiology. *Trends Endocrinol. Metab.* 2010.
- 457 7. Lee, H.S. Impact of maternal diet on the epigenome during in utero life and the developmental  
458 programming of diseases in childhood and adulthood. *Nutrients* 2015.
- 459 8. Hales, C.; Barker, D. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: the thrifty phenotype hypothesis.  
460 *Int. J. Epidemiol.* **2013**, *42*, 1215–1222.
- 461 9. Barker DJ, Osmond C, Kajantie E, E.J. Growth and chronic disease: findings in the Helsinki Birth Cohort.  
462 *Ann Hum Biol* **2009**.
- 463 10. Ferreira DJ, Sellitti DF, L.C. Protein undernutrition during development and oxidative impairment in the  
464 central nervous system (CNS): potential factors in the occurrence of metabolic syndrome and CNS  
465 disease. *J Dev Orig Heal. Dis.* **2016**.
- 466 11. Esteves, S.C.; Miyaoka, R.; Agarwal, A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics*  
467 **2011**.
- 468 12. Faure, C.; Dupont, C.; Chavatte-Palmer, P.; Gautier, B.; Levy, R. Are semen parameters related to birth  
469 weight? *Fertil. Steril.* **2015**.
- 470 13. Luca Boeri, Eugenio Ventimiglia, Paolo Capogrosso, Silvia Ippolito, Angela Pecoraro, Marco Paciotti,  
471 Roberta Scano, Alessandro Galdini, Luca Valsecchi, Enrico Papaleo, Francesco Montorsi, and A.S.\* Low  
472 Birth Weight Is Associated with a Decreased Overall Adult Health Status and Reproductive Capability –  
473 Results of a Cross-Sectional Study in Primary Infertile Patients. *PLoS One* **2016**, *11*.
- 474 14. Langle-Evans S.C. · McMullen S. Developmental Origins of Adult Disease. *Med. Princ. Pract.* **2010**, *19*.
- 475 15. Fleming, T.P.; Watkins, A.J.; Sun, C.; Velazquez, M.A.; Smyth, N.R.; Eckert, J.J. Do little embryos make big

- 476 decisions? How maternal dietary protein restriction can permanently change an embryo's potential,  
477 affecting adult health. *Reprod. Fertil. Dev.* **2015**.
- 478 16. Toledo, F.C.; Perobelli, J.E.; Pedrosa, F.P.C.; Anselmo-Franci, J.A.; Kempinas, W.D.G. In utero protein  
479 restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. *Reprod. Biol. Endocrinol.*  
480 **2011**.
- 481 17. Gonzalez-Rodriguez, P.J.; Xiong, F.; Li, Y.; Zhou, J.; Zhang, L. Fetal hypoxia increases vulnerability of  
482 hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats: Role of glucocorticoid receptors. *Neurobiol. Dis.* **2014**.
- 483 18. Jost A The age factor in the castration of male rabbit fetuses. *Proc Soc Exp Biol Med.* **1947**.
- 484 19. Staack A, Donjacour AA, Brody J, Cunha GR, C.P. Mouse urogenital development: a practical approach.  
485 *Differentiation.* **2003**.
- 486 20. Joseph, A.; Yao, H.; Hinton, B.T. Development and morphogenesis of the Wolffian/epididymal duct,  
487 more twists and turns. *Dev. Biol.* **2009**.
- 488 21. Robaire B, Hinton BT, O.-C.M. *The epididymis. In: The physiology of reproduction*; Knobil E., Neill J.D, Eds.;  
489 Elsevier.; New York, 2006;
- 490 22. Xu, B.; Yang, L.; Lye, R.J.; Hinton, B.T. p-MAPK1/3 and DUSP6 Regulate Epididymal Cell Proliferation  
491 and Survival in a Region-Specific Manner in Mice1. *Biol. Reprod.* **2010**, *83*, 807–817.
- 492 23. Yeung CH, Sonnenberg-Riethmacher E, C.T. Receptor tyrosine kinase c-ros knockout mice as a model for  
493 the study of epididymal regulation of sperm function. *J Reprod Fertil Suppl* **1998**.
- 494 24. Robaire B, H.N. Actions of 5alpha-reductase inhibitors on the epididymis. *Mol Cell Endocrinol.* **2006**.
- 495 25. Yan-Ping, D.; Xiao-Qin, G.; Xiao-Ping, M.; Ying-Quan, Y. Corrigendum #2 to "Effects of Chronic Exposure  
496 to Sodium Arsenite on Expressions of VEGF and VEGFR2 Proteins in the Epididymis of Rats." *Biomed*  
497 *Res. Int.* **2018**.
- 498 26. Da Silva, N.; Piétrement, C.; Brown, D.; Breton, S. Segmental and cellular expression of aquaporins in the  
499 male excurrent duct. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2006**.
- 500 27. Pastor-Soler, N.; Bagnis, C.; Sabolic, I.; Tyszkowski, R.; McKee, M.; Van Hoek, A.; Breton, S.; Brown, D.  
501 Aquaporin 9 Expression along the Male Reproductive Tract1. *Biol. Reprod.* **2005**.
- 502 28. Badran, H.H.; Hermo, L.S. *Expression and Regulation of Aquaporins 1, 8, and 9 in the Testis, Efferent Ducts,*  
503 *and Epididymis of Adult Rats and During Postnatal Development*; 2002; Vol. 23;.
- 504 29. Cavariani, M.M.; de Mello Santos, T.; Pereira, D.N.; de Almeida Chuffa, L.G.; Felipe Pinheiro, P.F.;  
505 Scarano, W.R.; Domeniconi, R.F. Maternal protein restriction differentially alters the expression of AQP1,  
506 AQP9 and VEGFr-2 in the epididymis of rat offspring. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*.
- 507 30. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein  
508 utilizing the principle of protein– dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.
- 509 31. Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, O.C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological  
510 basis. *Int J Epidemiol.* **2002**.
- 511 32. Gluckman PD, H.M. The Consequences of Being Born Small – An Adaptive Perspective. *Horm Res* **2006**.
- 512 33. Indrio, F.; Martini, S.; Francavilla, R.; Corvaglia, L.; Cristofori, F.; Mastroli, S.A.; Neu, J.; Rautava, S.;  
513 Russo Spina, G.; Raimondi, F.; et al. Epigenetic Matters: The Link between Early Nutrition, Microbiome,  
514 and Long-term Health Development. *Front. Pediatr.* **2017**.
- 515 34. Reckmann, A.N.; Tomczyk, C.U.M.; Davidoff, M.S.; Michurina, T. V.; Arnhold, S.; Müller, D.; Mietens, A.;  
516 Middendorff, R. Nestin in the epididymis is expressed in vascular wall cells and is regulated during  
517 postnatal development and in case of testosterone deficiency. *PLoS One* **2018**.
- 518 35. Karaman, S.; Leppänen, V.-M.; Alitalo, K. Vascular endothelial growth factor signaling in development  
519 and disease. *Development* **2018**.
- 520 36. Ergün, S.; Luttmer, W.; Fiedler, W.; Holstein, A.F. Functional Expression and Localization of Vascular  
521 Endothelial Growth Factor and Its Receptors in the Human Epididymis1. *Biol. Reprod.* **2005**.

- 522 37. Colombelli, K.T.; Santos, S.A.A.; Camargo, A.C.L.; Constantino, F.B.; Barquilha, C.N.; Rinaldi, J.C.;  
523 Felisbino, S.L.; Justulin, L.A. Impairment of microvascular angiogenesis is associated with delay in  
524 prostatic development in rat offspring of maternal protein malnutrition. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2017**.
- 525 38. Setchell, B.P.; Breed, W.G. Anatomy, vasculature, and innervation of the male reproductive tract. In  
526 *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*; 2006 ISBN 9780125154000.
- 527 39. Dacheux, J.L.; Dacheux, F. New insights into epididymal function in relation to sperm maturation.  
528 *Reproduction* 2014.
- 529 40. Agre, P. Aquaporin water channels (nobel lecture). *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2004.
- 530 41. Verkman, A.S.; Mitra, A.K. Structure and function of aquaporin water channels. *Am. J. Physiol. Physiol.*  
531 **2017**.
- 532 42. Pelagalli, A.; Squillacioti, C.; Mirabella, N.; Meli, R. Aquaporins in health and disease: An overview  
533 focusing on the gut of different species. *Int. J. Mol. Sci.* 2016.
- 534 43. Wei, X.; Dong, J. Aquaporin 1 promotes the proliferation and migration of lung cancer cell in vitro. *Oncol.*  
535 *Rep.* **2015**.
- 536 44. Ricanek, P.; Lunde, L.K.; Frye, S.A.; Støen, M.; Nygård, S.; Morth, J.P.; Rydning, A.; Vatn, M.H.; Amiry-  
537 Moghaddam, M.; Tønjum, T. Reduced expression of aquaporins in human intestinal mucosa in early  
538 stage inflammatory bowel disease. *Clin. Exp. Gastroenterol.* **2015**.
- 539 45. Yang, J.H.; Yan, C.X.; Chen, X.J.; Zhu, Y.S. Expression of aquaglyceroporins in epithelial ovarian tumours  
540 and their clinical significance. *J. Int. Med. Res.* **2011**.
- 541 46. Zhang, W. guang; Li, C. fei; Liu, M.; Chen, X. feng; Shuai, K.; Kong, X.; Lv, L.; Mei, Z. chuan Aquaporin 9  
542 is down-regulated in hepatocellular carcinoma and its over-expression suppresses hepatoma cell invasion  
543 through inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition. *Cancer Lett.* **2016**.
- 544 47. Nagahara, M.; Waguri-Nagaya, Y.; Yamagami, T.; Aoyama, M.; Tada, T.; Inoue, K.; Asai, K.; Otsuka, T.  
545 TNF-alpha-induced aquaporin 9 in synoviocytes from patients with OA and RA. *Rheumatology (Oxford).*  
546 **2010**.
- 547 48. Choi, Y.S.; Park, J.H.; Yoon, J.-K.; Yoon, J.S.; Kim, J.S.; Lee, J.H.; Yun, B.H.; Park, J.H.; Seo, S.K.; Cho, S.; et  
548 al. Potential roles of aquaporin 9 in the pathogenesis of endometriosis. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* **2019**.
- 549 49. Yeste, M.; Morató, R.; Rodríguez-Gil, J.E.; Bonet, S.; Prieto-Martínez, N. Aquaporins in the male  
550 reproductive tract and sperm: Functional implications and cryobiology. *Reprod. Domest. Anim.* 2017.
- 551 50. Huang, H.F.; He, R.H.; Sun, C.C.; Zhang, Y.; Meng, Q.X.; Ma, Y.Y. Function of aquaporins in female and  
552 male reproductive systems. *Hum. Reprod. Update* 2006.
- 553 51. Brown, D.; Verbavatz, J.M.; Valenti, G.; Lui, B.; Sabolić, I. Localization of the CHIP28 water channel in  
554 reabsorptive segments of the rat male reproductive tract. *Eur. J. Cell Biol.* **1993**.
- 555 52. Arrighi, S.; Aralla, M.; Genovese, P.; Picabea, N.; Bielli, A. Undernutrition during foetal to prepubertal life  
556 affects aquaporin 9 but not aquaporins 1 and 2 expression in the male genital tract of adult rats.  
557 *Theriogenology* **2010**.
- 558 53. King, L.S.; Kozono, D.; Agre, P. From structure to disease: The evolving tale of aquaporin biology. *Nat.*  
559 *Rev. Mol. Cell Biol.* 2004.
- 560 54. Elkjar, M.L.; Vajda, Z.; Nejsum, L.N.; Kwon, T.H.; Jensen, U.B.; Amiry-Moghaddam, M.; Frokiar, J.;  
561 Nielsen, S. Immunolocalization of AQP9 in liver, epididymis, testis, spleen, and brain. *Biochem. Biophys.*  
562 *Res. Commun.* **2000**.
- 563 55. Pastor-Soler, N.; Isnard-Bagnis, C.; Herak-Kramberger, C.; Sabolic, I.; Van Hoek, A.; Brown, D.; Breton, S.  
564 Expression of Aquaporin 9 in the Adult Rat Epididymal Epithelium Is Modulated by Androgens1. *Biol.*  
565 *Reprod.* **2005**.
- 566 56. Turner, T.T.; Johnston, D.S.; Jelinsky, S.A.; Tomsig, J.L.; Finger, J.N. Segment boundaries of the adult rat  
567 epididymis limit interstitial signaling by potential paracrine factors and segments lose differential gene  
568 expression after efferent duct ligation. *Asian J. Androl.* 2007.



- 569 57. Zambrano, E.; Rodríguez-González, G.L.; Guzmán, C.; García-Becerra, R.; Boeck, L.; Díaz, L.; Menjivar,  
570 M.; Larrea, F.; Nathanielsz, P.W. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat  
571 impairs male reproductive development. *J. Physiol.* **2005**.
- 572 58. Zhou, W.; De Iuliis, G.N.; Dun, M.D.; Nixon, B. Characteristics of the epididymal luminal environment  
573 responsible for sperm maturation and storage. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **2018**.
- 574 59. Agre, P.; Kozono, D. Aquaporin water channels: Molecular mechanisms for human diseases. In  
575 Proceedings of the FEBS Letters; 2003.
- 576 60. Rojek, A.M.; Skowronski, M.T.; Füchtbauer, E.M.; Füchtbauer, A.C.; Fenton, R.A.; Agre, P.; Frøkiær, J.;  
577 Nielsen, S. Defective glycerol metabolism in aquaporin 9 (AQP9) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*  
578 *S. A.* **2007**.
- 579 61. Watanabe, S.; Moniaga, C.S.; Nielsen, S.; Hara-Chikuma, M. Aquaporin-9 facilitates membrane transport  
580 of hydrogen peroxide in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**.
- 581 62. Laforenza, U.; Pellavio, G.; Marchetti, A.L.; Omes, C.; Todaro, F.; Gastaldi, G. Aquaporin-mediated water  
582 and hydrogen peroxide transport is involved in normal human spermatozoa functioning. *Int. J. Mol. Sci.*  
583 **2017**.
- 584 63. Xu, B.; Turner, S.D.; Hinton, B.T. Alteration of transporter activities in the epididymides of infertile initial  
585 segment-specific Pten knockout mice. *Biol. Reprod.* **2018**.
- 586 64. Lei, Z.M.; Mishra, S.; Zou, W.; Xu, B.; Foltz, M.; Li, X.; Rao, C. V. Targeted Disruption of Luteinizing  
587 Hormone/Human Chorionic Gonadotropin Receptor Gene. *Mol. Endocrinol.* **2014**.
- 588 65. Rodríguez-González, G.L.; Reyes-Castro, L.A.; Vega, C.C.; Boeck, L.; Ibáñez, C.; Nathanielsz, P.W.;  
589 Larrea, F.; Zambrano, E. Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-  
590 restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. *Age (Omaha)*. **2014**.
- 591 .
- 592 .



© 2019 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

593

## *Capítulo III*

1           **Dieta Materna de Baixa Proteína modula ERK/Src e Wnt9b nas fases iniciais do**  
2 **desenvolvimento epididimário na prole masculina de ratos Wistar.**

3  
4           O epidídimo desempenha papel importante na maturação dos espermatozoides,  
5 incluindo a aquisição de motilidade progressiva e a capacidade de fertilização. É originado do  
6 ducto mesonéfrico e deve alcançar a forma, tamanho e comprimento ideal para se tornar  
7 funcional. Assim, é essencial que os complexos processos morfogênicos sejam regulados e  
8 ocorram no tempo certo do desenvolvimento epididimário pré e pós-natal (Xu *et al.*, 2014).

9           A estabilização e diferenciação do ducto mesonéfrico é dependente de diferentes  
10 fatores, que incluem hormônios sexuais e fatores de crescimento. Os andrógenos, produzidos  
11 pelos testículos fetais, são responsáveis pela estabilização do ducto e, fatores de crescimento,  
12 modulados por andrógenos, estão diretamente relacionados a regulação dos processos de  
13 enovelamento, migração, proliferação e diferenciação celular, eventos responsáveis pela  
14 formação do epidídimo (Welsh *et al.*, 2009; Kumar e Tanwar, 2017).

15           O ducto epididimário ao final da sua morfogênese atinge mais três metros no rato e  
16 seis metros no humano. Assim, este ducto dobra-se em uma estrutura organizada, de modo  
17 que permaneça com comprimento e forma adequados para a passagem dos espermatozoides  
18 (Joseph *et al.*, 2009).

19           Em ratos, no dia gestacional 17,5, o ducto mesonéfrico inicia, na região mais  
20 proximal, o enovelamento bidimensional. O enovelamento progride gradualmente ao longo  
21 do ducto e no DG20,5, inicia-se o enovelamento tridimensional (Joseph *et al.*, 2009; Hinton  
22 *et al.*, 2011). Concomitantemente ao enovelamento, o processo de alongamento do ducto  
23 ocorre através de dois eventos principais: proliferação e rearranjos das células epiteliais (Xu  
24 *et al.*, 2016). O enovelamento e o alongamento ainda continuam durante o período pós-natal,  
25 juntamente com a formação dos septos que permitem a divisão do ducto em vários  
26 segmentos. Embora existam diversos mediadores dos processos de alongamento e  
27 enovelamento, ainda não está claro como os mecanismos modulam o comprimento e a forma  
28 do ducto epididimário (Kumar e Tanwar, 2016).

29           A sinalização Wnt desempenha um papel fundamental no desenvolvimento  
30 embrionário e pós-natal de diferentes sistemas. É amplamente expressa nos órgãos  
31 precursores dos genitais, incluindo o ducto mesonéfrico, e está relacionada a proliferação e  
32 a polaridade celular, sendo então considerada essencial para o correto alongamento e  
33 enovelamento do epidídimo (Tanwar *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2016). No epitélio do ducto

34 mesonéfrico, a Wnt9 é amplamente expressa e, animais nocaute para esta proteína  
35 apresentaram falhas no desenvolvimento embrionário e nas fases iniciais pós-natais  
36 associadas a proliferação e integridade das células epiteliais do epidídimo (Karner *et al.*,  
37 2009; Kumar e Tanwar, 2017).

38 A proliferação celular, no segmento inicial do epidídimo pós-natal, também é  
39 regulada via quinases, a família de quinases Src, que por sua vez são reguladas por sinais  
40 extracelulares (ERK). Assim, o período entre o final do desenvolvimento embrionário e o  
41 início do desenvolvimento pós-natal é extremamente importante, pois é durante este período  
42 que o ducto mesonéfrico sofre regionalização e os tecidos epitelial e mesenquimal passam  
43 por alterações morfológicas e atingem a maturidade (Snyder *et al.*, 2010).

44 As proteínas Src são proteínas quinases não receptoras, que desempenham papel  
45 chave na regulação da transdução de sinal por um conjunto diverso de receptores da  
46 superfície celular (Parsons and Parsons, 2004). Recentemente tem se destacado o papel  
47 essencial das Src no desenvolvimento epididimário e também em alterações importantes  
48 relacionadas à capacidade de maturação dos espermatozoides (Krapf *et al.*, 2012).

49 Krapf e colaboradores (2012) mostraram que camundongos Src nocaute apresentam  
50 espermatozoides com motilidade reduzida e são incapazes de fertilizar um ovócito *in vitro*.  
51 Nesses animais, os testículos e cabeça e corpo epididimários aparentam ser normais, no  
52 entanto, a cauda do epidídimo apresentou tamanho reduzido quando comparada ao animal  
53 controle. Baseado nos resultados desse estudo, os autores atribuíram papel essencial para Src  
54 no desenvolvimento epididimário e sugeriram, que Src também é responsável por  
55 importantes alterações na capacidade de maturação dos espermatozoides que ocorrem  
56 durante sua passagem pelo epidídimo (Krapf *et al.*, 2012).

57 Dentre as regiões epididimária, o segmento inicial (SI) tem papel fundamental na  
58 maturação dos espermatozoides, e assim sua correta formação é fundamental (Xu *et al.*,  
59 2014). O SI contém altos níveis de atividade dos componentes da via ERK, sendo esta via  
60 formada por uma cascata de proteínas-quinases intracelulares, tais como MAPK3 e/ou  
61 MAPK1 (conhecido como ERK1 e ERK2). Durante as fases iniciais do desenvolvimento  
62 pós-natal, a ERK1/2 é ativada para que haja a promoção da proliferação celular e  
63 citodiferenciação das células principais e células basais (Xu *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2014;  
64 2010; Rodriguez *et al.*, 2002).

65 Na última década, estudos tem relacionado a infertilidade masculina a defeitos  
66 congênitos ocasionados por falhas durante o desenvolvimento embrionário e fetal (Esteves *et*  
67 *al.*, 2011). Dependendo das condições do ambiente materno, o embrião pode sofrer uma



68 programação fetal, alterando a formação e funcionamento dos órgãos, na tentativa de prever  
69 as condições ambientais que irá viver. No entanto, essas alterações podem levar a má formação  
70 e funcionamento dos órgãos de maneira irreversível, bem como o desenvolvimento de doenças  
71 na idade adulta (Barker *et al.*, 1989; Langley-Evans e McMullen, 2010).

72 Dentre os modelos conhecidos de programação fetal, a restrição proteica na dieta  
73 oferecida a ratas gestantes e/ou lactantes é um dos modelos mais utilizados (Langley-Evans e  
74 McMullen, 2010; Fleming *et al.*, 2017). A literatura reporta que ratos adultos, cujas as mães  
75 foram submetidas a restrição proteica gestacional, apresentaram alterações associadas às  
76 funções do epidídimo, como: redução da motilidade, viabilidade e concentração espermática,  
77 alterações morfológicas e a presença de gota citoplasmática (Toledo *et al.*, 2011; Rodriguez-  
78 Gonzalez *et al.*, 2014). Entretanto, apesar dos estudos mostrarem os efeitos da desnutrição  
79 materna sobre as funções epididimária, não há trabalhos na literatura que mostrem se estas  
80 alterações podem ter ocorrido durante fases importantes do desenvolvimento do epidídimo,  
81 bem como, os possíveis mecanismos que possam estar ligados a falhas na funcionalidade deste  
82 órgão na idade adulta.

83

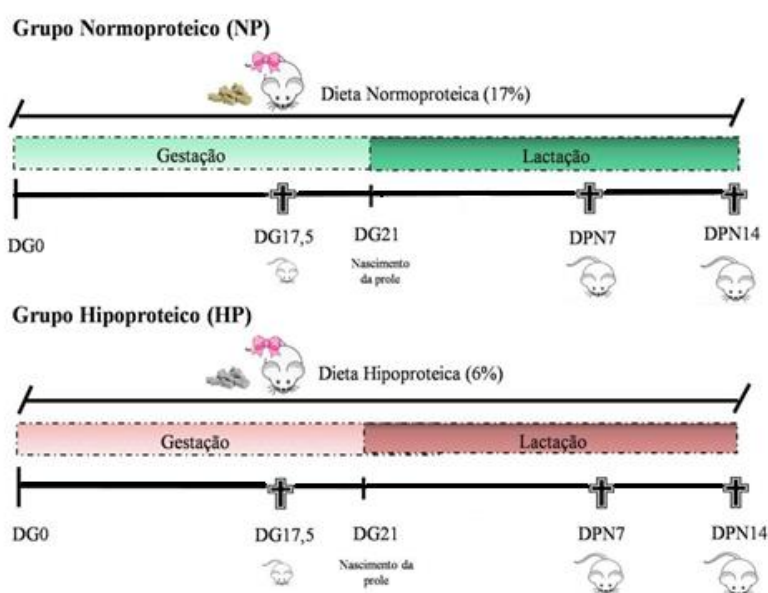
#### 84 **Delineamento experimental**

85 Ratos da linhagem *Wistar* (40 fêmeas com 60 dias de idade e 20 machos com 90 dias  
86 de idade), provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista – UNESP –  
87 Campus de Botucatu/SP, foram mantidos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento  
88 de Anatomia do Instituto de Biociências da UNESP – Campus Botucatu, em gaiolas de  
89 polietileno (43x30x15cm) com substrato de maravalha autoclavada, em condições controladas  
90 de luminosidade (12 horas de luz/12 horas de escuro) e temperatura (média de 22°C). Os  
91 animais receberam água e ração para roedores *ad libitum*.

92 Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos  
93 na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal  
94 (COBEA) e foram aprovados junto à Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)  
95 do Instituto de Biociências de Botucatu sob o número 798-CEUA.

96 Após a aclimação dos animais, duas fêmeas e um macho foram alojados em caixas  
97 maternidade durante o período escuro do ciclo. No dia seguinte, foram realizados esfregaços  
98 vaginais, utilizando água destilada e *swab* estéril, seguidos da análise das lâminas em  
99 microscópio de luz, onde a presença de espermatozoides indicou a prenhez do animal,  
100 marcando assim o dia 0 da gestação (GD 0).

101 Após a detecção da prenhez as ratas foram aleatoriamente transferidas para caixas  
 102 individuais para formação dos grupos maternos experimentais: grupo normoproteico (NP): 19  
 103 mães alimentadas com dieta normoproteica AIN-93G *ad libitum* (17% de proteína); grupo  
 104 hipoproteico (HP): 19 mães alimentadas com dieta AIN-93G hipoproteica *ad libitum* (6% de  
 105 proteína). As dietas foram administradas durante toda a gestação até o dia pós-natal (DPN) 14  
 106 da prole. A dieta AIN-93G foi formulada pelo Instituto Americano de Nutrição projetada para  
 107 acomodar o aumento das demandas nutricionais para crescimento, prenhez e lactação de  
 108 roedores.  
 109



110

111 **Figura 1:** Ilustração do delineamento experimental.

112

113 Durante a gestação, 5 ratas de cada grupo experimental foram laparotomizadas para a  
 114 coleta dos embriões machos no DG17,5 e as demais ratas prenhes seguiram até o final da  
 115 gestação (DG21) (ver detalhes da metodologia em Xu *et al.*, 2016)

116 Após o nascimento, o tamanho da ninhada foi padronizado para oito filhotes por mãe,  
 117 em ambos os grupos experimentais, para garantir a igualdade de alimento para todos os filhotes.  
 118 Os filhotes permaneceram com as mães em caixas individuais até o momento da eutanásia nos  
 119 DPN7 (NP=17/grupo; HP=19/grupo), ou DPN14 (NP=19/grupo; HP=26/grupo).

120 Nos dias das coletas, os filhotes machos foram anestesiados com Ketamina e Xilasina,  
 121 e eutanasiados por decapitação. Os epidídimos foram coletados, pesados e acondicionados em  
 122 criotubos, submersos em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C até o momento da extração  
 123 de proteínas para realização da técnica de *Western blotting*.

## 124 **Cultura tecidual dos ductos mesonéfricos**

125 Para cultura de tecido, os ductos mesonéfricos foram coletados isoladamente, sem os  
126 testículos, e a bexiga urinária foi reduzida ao máximo. Os ductos foram alocados em placa de  
127 6 poços contendo meio de cultura (PEN Strep, DMEM, Insulin-Transferrin-Selenium (ITS),  
128 Testosterona 10nm) e incubados em CO<sub>2</sub> em temperatura de 37°C. Os ductos em cultura foram  
129 analisados, para ver se havia desenvolvimento, e posteriormente, fotografados e tiveram o  
130 comprimento mensurado nos tempos de 0, 24, 48 horas utilizando o programa Image J para  
131 Windows<sup>®</sup>.

132

## 133 **Extração e quantificação de proteínas e Western blotting no DPN 7 e DNP14**

134 Os epidídimos dos animais nas idades de 7 e 14 dias pós-natais foram processados  
135 inteiros (devido ao tamanho pequeno do órgão não foi possível a divisão em segmentos) e foram  
136 feitos *pools* de 3 ou mais animais. As amostras foram processadas a 4°C em tampão RIPA  
137 (BioRad<sup>®</sup>, BioRad Laboratories, USA; 30mg de tecido/100µl de tampão de extração) e coquetel  
138 de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, USA) em homogeneizador do tipo Tureaux em 3  
139 ciclos de 10 segundos. O homogeneizado foi centrifugado a 14.000 rpm a 4°C por 20 minutos  
140 e o sobrenadante coletado. A quantificação de proteínas foi realizada em placas de ELISA com  
141 96 poços, em leitor de ELISA (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek<sup>®</sup>) pelo método  
142 de Bradford (Bradford, 1976).

143 As alíquotas foram tratadas com tampão fosfato de sódio 1M pH 7,0 contendo azul de  
144 bromofenol 0,1%, glicerol 50%, SDS 10% e ditioneitol 100mM (Laemmli, 1970) e aquecidas  
145 a 95°C por 5 minutos em banho seco. Em seguida, 70 µg/µL das proteínas foram separadas por  
146 eletroforese vertical (Mini-Protean, BioRad<sup>®</sup>) em gel de SDS-poliacrilamida a 10% utilizando-  
147 se protocolo de 70V por 15 minutos, seguido de 120V por mais 1 hora e meia. A eletro-  
148 transferência do gel para membrana de nitrocelulose foi feita em sistema úmido a 350ma.  
149 Ligações inespecíficas de proteínas foram bloqueadas por meio da exposição das membranas  
150 ao Leite Molico<sup>®</sup> 3% em tampão TBST (Tris base 1M, NaCl 5M e Tween 20) por 1 hora em  
151 temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com os anticorpos  
152 primários: **Wnt9b** (1:500, Milipore – USA), **ERK1/2** (1:1000, Milipore – USA), **SRC-Y416**  
153 (1:800, Cell Signaling – USA), **SRC-Y527** (1:1000, Cell Signaling), **PCNA** (1:800, Milipore -  
154 USA) e **β-actina** (1:800, Santa Cruz – USA), todos diluídos em TBST, e mantidas *overnight*  
155 sob agitação. No dia seguinte, foram realizadas 3 lavagens de 15 minutos com TBST, incubação  
156 com específico anticorpo secundário Anti-Rb ou Anti-mMs (1:2000, Sigma – USA) ou Anti-  
157 Goat (Sigma – USA) (1:6000) diluídos em TBST por 2 horas, e posteriormente mais 3 lavagens

158 de 15 minutos com TBST. Os componentes imunorreativos foram revelados a partir de  
 159 substratos quimioluminescentes (ECL), e as bandas obtidas foram submetidas à análise semi-  
 160 quantitativa por densitometria óptica (Image J for Windows<sup>®</sup>). Os valores obtidos para cada  
 161 banda das proteínas alvos foram normalizados pelos valores das bandas de  $\beta$ -actina.

162

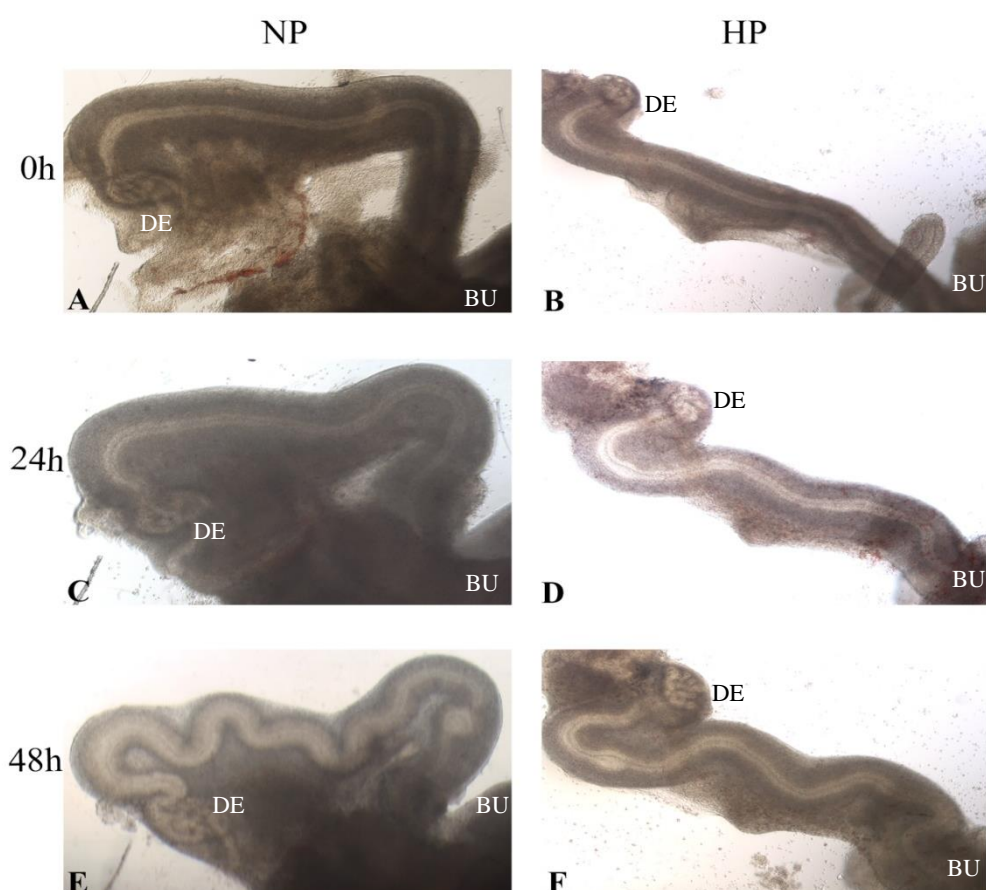
### 163 **Análise estatística**

164 Os dados foram analisados por meio do Teste T para dados paramétricos e Mann-  
 165 whitney para dados não-paramétricos, utilizando o software GraphPad Prism5<sup>®</sup>. Os valores  
 166 foram expressos em Média $\pm$ Erro Padrão da Média (EPM) e a significância equivalente a  
 167  $p < 0,05$ .

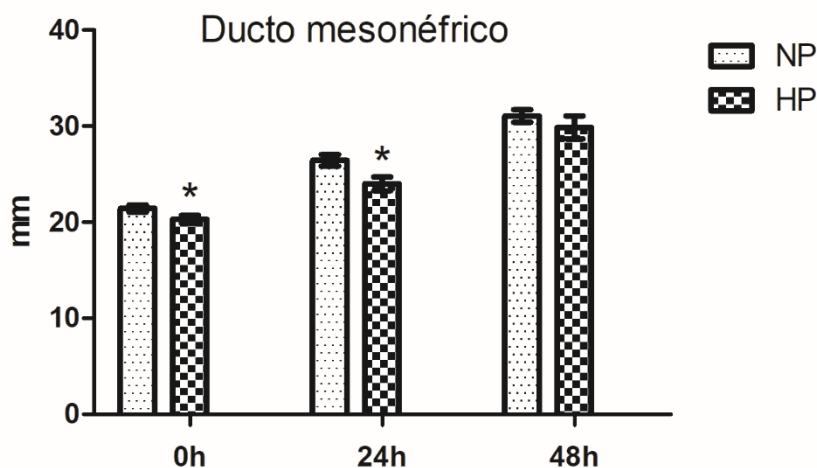
168

### 169 **Resultados e breves comentários**

170 Os ductos mesonéfrico foram coletados no E17,5 e mantidos em cultura por até 48  
 171 horas. No tempo 0h foi possível observar o início do enovelamento bidimensional em ambos  
 172 os grupos. Após a análise morfométrica, os ductos do grupo HP (Fig. 2B) mostraram ter menor  
 173 comprimento que do grupo NP (Fig. 2<sup>a</sup> e Fig. 3). No tempo 24h esta diferença ainda  
 174 permaneceu, sendo os ductos LP menores que NP (Fig. 2C e D; Fig. 3). Após 48h em cultura,  
 175 os ductos do grupo HP, apesar de parecerem menores que NP, a diferença não foi significativa  
 176 (Fig. 2E e F; Fig. 3).



177 **Figura 2:** Enovelamento dos ductos mesonéfricos em cultura tecidual com 0 (Fig. A e B), 24 (Fig. C e  
 178 D) e 48 (Fig. E e F), respectivamente nos grupos NP e HP. DE= Ductulos Eferentes; BU= Bexiga  
 179 Urinária.



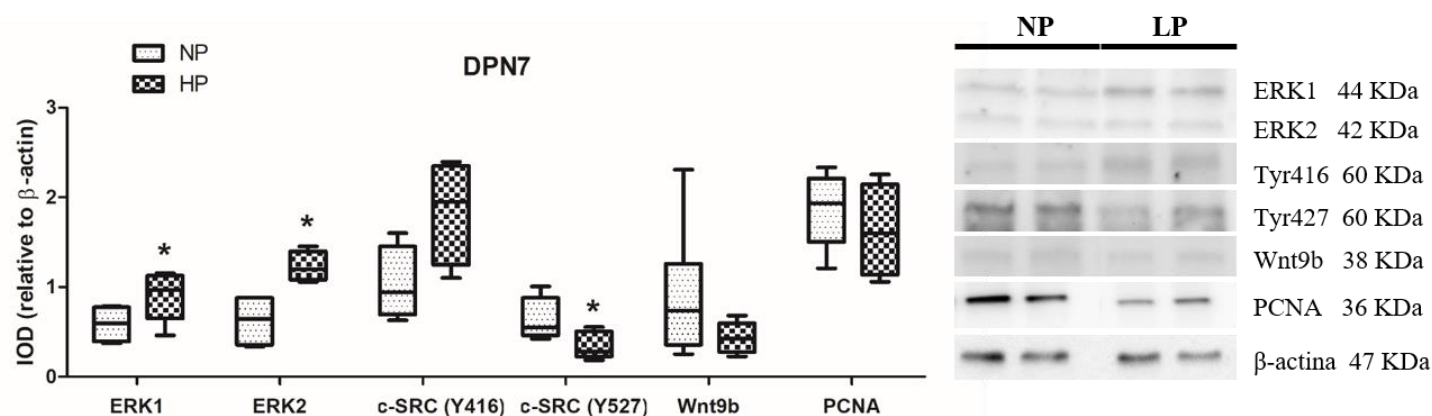
180

181 **Figura 3:** Comprimento dos ductos mesonéfricos (mm) em cultura tecidual com 0, 24 e 48 após a coleta  
 182 no E17,5, respectivamente nos grupos NP e HP.

183

184 No DPN7, os níveis da ERK1/2 aumentaram (fold-change 1,96 e 1,54 respectivamente)  
 185 e da SRC527 diminuíram (fold-change 0,54) nos animais HP comparados aos animais NP. Não  
 186 houve diferença significativa nos níveis proteicos da SRC416, Wnt9b e PCNA entre os grupos  
 187 experimentais (fold-change aumento de 1,80; diminuição de 0,71 e 0,87 respectivamente) (Fig.  
 188 4).

189



191

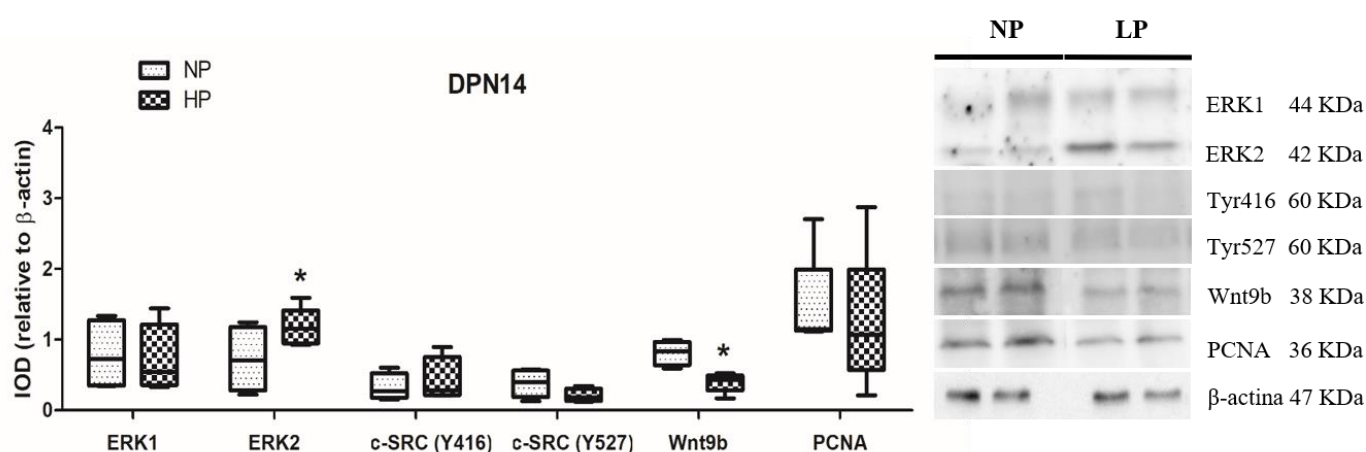
192 **Figura 4:** Análise dos níveis proteicos de ER1/2, SRC Y416 e Y527, Wnt9b e PCNA no DPN7. Níveis  
 193 proteicos das amostras do epidídimo, cada banda representa pool de 4 animais em NP e 5 animais em  
 194 HP. O gráfico representa a expressão relativa da densidade óptica integrada para a proteína normalizada

195 pela  $\beta$ -actina e expressa pela média $\pm$ EPM. O asterisco representa a diferença estatística do grupo restrito  
 196 (HP) em relação ao grupo controle (NP) ( $p < 0,05$ ).

197

198 No DPN14, os níveis da Wnt9b diminuíram (fold-change 0,49) e somente da ERK2  
 199 aumentaram (fold-change 1,63) nos animais HP comparados aos animais NP. Não houve  
 200 diferença significativa nos níveis proteicos da ERK1, SRC427, SRC416 e PCNA entre os  
 201 grupos experimentais (fold-change diminuição de 0,94; 0,54 e aumento de 1,37 e 1,11  
 202 respectivamente) (Fig. 5).

203



205

206 **Figura 5:** Análise dos níveis proteicos de ERK1/2, SRC Y416 e Y527, Wnt9b e PCNA no DPN14. Níveis  
 207 proteicos das amostras do epidídimo, cada banda representa pool de 4 animais em NP e 5 animais em  
 208 HP. O gráfico representa a expressão relativa da densidade óptica integrada para a proteína normalizada  
 209 pela  $\beta$ -actina e expressa pela média $\pm$ EPM. O asterisco representa a diferença estatística do grupo restrito  
 210 (HP) em relação ao grupo controle (NP) ( $p < 0,05$ ).

211

212 Nossos resultados mostraram que a restrição proteica materna, durante a gestação e  
 213 lactação, atrasa o início do crescimento do ducto mesonéfrico e diminui a expressão da Wnt9b.  
 214 Estes resultados sugerem que houve alterações na formação inicial do epidídimo. E, portanto,  
 215 os aumentos dos níveis proteicos da ERK1/2 e Src ativa observados, poderiam indicar uma  
 216 resposta do tecido para recuperar o crescimento do órgão nesta fase inicial do desenvolvimento  
 217 epididimário pós-natal.

218 Fatores não androgênicos estão claramente relacionados ao envelhecimento, migração,  
 219 proliferação e diferenciação celular do epidídimo, mas suas identidades e mecanismos ainda  
 220 não são completamente esclarecidos (Kumar e Tanwar, 2017).

221 Estudos em humanos e ratos têm destacado a importância da sinalização via Wnt para  
222 o desenvolvimento de órgãos urogenitais, tanto masculino quanto feminino (Biason-Lauberet  
223 *et al.*, 2004). Sabe-se que a desregulação desta via resulta em más formações durante o  
224 desenvolvimento dos órgãos genitais, bem como é essencial para o correto alongamento e  
225 enovelamento do ducto mesonéfrico (Tanwar *et al.*, 2010; Kumar *et al.*, 2016).

226 No período pós-natal do desenvolvimento epididimário em camundongos a sinalização  
227 da Wnt via  $\beta$ -catenina é altamente ativa no epidídimo, principalmente do DPN1 ao DPN35.  
228 Nas duas primeiras semanas após o nascimento (do DPN1 ao DPN14) a marcação da Wnt é  
229 igualmente distribuída em todas as regiões ao longo do ducto. No entanto, esta proteína é somente  
230 expressa no epitélio, sendo sua marcação ausente no mesênquima do ducto epididimário  
231 (Kumar e Tanwar, 2017).

232 Kumar e Tanwar (2017), utilizando camundongos nocaute para Wnt, mostraram que a  
233 supressão epitelial na sinalização de Wnt/ $\beta$ -catenina, nos estágios iniciais do desenvolvimento  
234 epididimário pós-natal, altera a integridade e diminui a proliferação celular. Estas alterações  
235 resultaram na redução do tamanho do epidídimo e do seu enovelamento, e afetaram  
236 negativamente a comunicação epitélio-mesênquima, levando a consequências como, atrofia do  
237 epitélio e lúmen ductal atípico.

238 Durante a morfogênese pré e pós-natal, o epidídimo expressa diversas Wnts. Dentre elas  
239 estão as Wnt4 e a Wnt9b, sendo que a Wnt9b é a mais expressa, atua com um sinal parácrino e  
240 está relacionada aos primeiros sinais do desenvolvimento do ducto mesonéfrico (Carroll *et al.*,  
241 2005). Nossos dados mostraram que a restrição proteica diminuiu os níveis da Wnt9b nas fases  
242 iniciais do desenvolvimento pós-natal. Este resultado pode indicar que a integridade das células  
243 epiteliais está sendo afetada, bem como possíveis mecanismos de proliferação celular. Além  
244 disso, este resultado pode estar relacionado a dados prévios obtidos pelo nosso grupo, que já  
245 mostraram que a restrição proteica materna altera a morfologia do epidídimo em  
246 desenvolvimento, por meio da diminuição na altura do epitélio e no diâmetro do ducto (dados  
247 ainda não publicados).

248 A diminuição da expressão da Wnt9b, fator que também atua sobre a promoção da  
249 proliferação celular do ducto durante a fase embrionária, pode estar relacionada à diminuição  
250 do comprimento do ducto mesonéfrico, encontrado nas primeiras horas do enovelamento.

251 O epidídimo em desenvolvimento também contém altos níveis de atividade das SRCs,  
252 sendo estas, outras moléculas-chave na sinalização da morfogênese epididimária (Xu *et al.*,  
253 2016). As SRCs são proteínas que pertencem à família de proteínas quinases não receptoras e  
254 desempenham papel chave na regulação da transdução de sinal, por um conjunto diverso de

255 receptores da superfície celular, atuando no crescimento e na diferenciação celular (Thomas e  
256 Brugge, 1997; Parsons and Parsons, 2004).

257 A atividade destas proteínas é regulada pela tirosina fosforilada (Csk) em dois locais  
258 que geram efeitos opostos. A fosforilação no loop de ativação do domínio quinase Tyr416  
259 aumenta a atividade enzimática. Já a fosforilação na cauda carboxiterminal Tyr527 por Csk  
260 torna a enzima menos ativa (Hunter, 1987). A SRC tem altos níveis de expressão no período  
261 entre o final do desenvolvimento embrionário e o início do desenvolvimento pós-natal. Sendo  
262 assim, é extremamente importante a avaliação desta via, pois é durante este período que o ducto  
263 mesonéfrico sofre regionalização e os tecidos passam por alterações morfológicas que originam  
264 os tecidos totalmente maduros (Snyder *et al.*, 2010).

265 No DPN7 foi observado que houve diminuição do PCNA, marcador da proliferação  
266 celular, apesar de não significativo, no grupo HP em relação ao controle. Nesta mesma idade,  
267 também foi observado aumento significativo nos níveis da Src ativa acompanhada do aumento  
268 da expressão de ERK1/2 no grupo HP em relação ao NP.

269 A proliferação celular na região de segmento inicial do epidídimo, na fase pós-natal, é  
270 regulada via SRCs. Estas, por sua vez, são reguladas por sinais intracelulares. A via ERK é uma  
271 cascata de proteínas-quinases intracelulares, tais como MAPK3 e/ou MAPK1, também como  
272 ERK1 e ERK2. Xu e colaboradores (2016) mostraram que a deleção do gene SRC em  
273 camundongos e a inibição farmacológica da atividade da SRC resultaram em diminuição da  
274 atividade da ERK1/2, sugerindo que no epidídimo, a sinalização da SRC pode ocorrer por meio  
275 da via ERK e consequentemente, a ERK passa a também regular a proliferação e diferenciação  
276 celular do SI.

277 Os primeiros estágios do desenvolvimento epididimário pós-natal, antes do DPN15 no  
278 rato, são referidos como períodos indiferenciados. Durante esses estágios, as células epiteliais  
279 do segmento inicial ainda não foram expostas a fatores luminais, pois a primeira onda luminal  
280 ocorre somente após esta idade. Ou seja, as células epiteliais indiferenciadas ainda não  
281 dependem de fatores luminais para proliferação e manutenção (Xu *et al.*, 2016). É importante  
282 ressaltar que, principalmente no segmento inicial, a via ERK expressa altos níveis de atividade  
283 e, portanto, esta região responde intensa e rapidamente aos fatores luminais. No entanto, parece  
284 que antes da primeira onda de fatores luminais outros elementos parecem influenciar sobre esta  
285 via (Xu *et al.*, 2014).

286 Animais nocautes AR-SI específico tiveram as atividades da via ERK reduzidas e  
287 posteriormente, nos animais adultos, foi constatado o comprometimento da diferenciação do SI  
288 e, consequentemente, esses animais eram inférteis (Krutskikh *et al.*, 2011). Nossos resultados



289 prévios mostraram que houve aumento da imunomarcção de AR nas células epiteliais do  
290 segmento inicial nos animais do grupo HP, bem como aumento de AR nas células  
291 mesenquimais, demonstrando atraso na citodiferenciação nos epidídimos restritos (dados ainda  
292 não publicados).

293 Esses dados podem estar relacionados aos resultados obtidos para a via SRC/ERK. O  
294 aumento da atividade destas proteínas sugere aumento das atividades de proliferação e  
295 diferenciação celular na região SI, neste período inicial, o que compensaria o atraso observado.

296 Esta hipótese pode ser fortalecida ao observamos que no DPN14 houve aumento do  
297 PCNA, mesmo que não significativo, no grupo HP, em relação ao controle. Bem como, o  
298 reestabelecimento dos níveis SRC/ERK do grupo HP em relação aos níveis das mesmas  
299 proteínas no grupo NP.

300 Outro fato interessante, porém, ainda pouco estudado é a correlação entre o estradiol e  
301 os níveis de atividade ERK. Recentemente, por meio de células de câncer de mama,  
302 pesquisadores observaram uma relação entre o aumento do estradiol e aumento na ativação da  
303 fosforilação da via ERK (Elloumi-Mseddi *et al.*, 2014). Sabe-se que os estrogênios podem  
304 induzir aumentos rápidos nos níveis de mensageiros intracelulares secundários, incluindo cálcio  
305 e AMPc, bem como a ativação da fosfolipase C (Collins e Webb, 1999). Assim, dados sugerem  
306 que a sinalização da ERK via SRC pode sofrer uma ativação direta, porém rápida e transitória,  
307 por meio da expressão dos receptores de estrógenos (ER). O curso do tempo dessa ativação se  
308 assemelha ao dos hormônios peptídicos, apoiando a hipótese de que eles não envolvem a ação  
309 genômica “clássica” dos estrogênios (Wong *et al.*, 2002).

310 A restrição proteica materna aumenta os níveis de estradiol sérico nos filhotes machos  
311 e aumenta a expressão de ER $\alpha$  no tecido epididimário no DPN7 (dados ainda não publicados),  
312 mesmo período em que foram observados o aumento da expressão da SRC/ERK. Esses dados  
313 podem reforçar a hipótese de que esta via pode ser modulada pela expressão de ER, por meio  
314 de uma ação rápida e transitória.

315 Assim, concluímos que a restrição proteica materna leva a um atraso no  
316 desenvolvimento do ducto mesonéfrico e nas fases iniciais no desenvolvimento pós-natal, e  
317 como consequência desse atraso, é possível observar o aumento da atividade da via SRC/ERK,  
318 que poderia ser considerada como tentativa de recuperar o correto desenvolvimento  
319 epididimário.

*Conclusões*

1           Nossos resultados mostraram que programação fetal por restrição proteica materna leva  
2 ao aumento de estradiol sérico na prole masculina e causa alterações importantes nas fases  
3 iniciais do desenvolvimento epididimário pós-natal, como: diminui a densidade microvascular;  
4 compromete o microambiente luminal; causa estrogenização do tecido epididimário;  
5 compromete a citodiferenciação modulada por hormônios e fatores de crescimento; altera a  
6 expressão de proteínas importantes que atuam na interação epitélio-mesênquima; altera a  
7 atividade de proteínas que modulam a proliferação celular e citodiferenciação, e ainda na fase  
8 embrionária, atrasa o desenvolvimento do ducto mesonéfrico. Assim, constrói-se a hipótese de  
9 que essas alterações durante as fases iniciais do desenvolvimento possam estar relacionadas às  
10 alterações encontradas nas funções do epidídimo em ratos adultos cujas mães sofreram restrição  
11 proteica nas fases de gestação e lactação.

*Referências*  
*Bibliográficas*

- Agarwal P, Morriseau T S, Kereliuk S M, Doucette C A, Wicklow B A, Dolinsky V W. Maternal obesity, diabetes during pregnancy and epigenetic mechanisms that influence the developmental origins of cardiometabolic disease in the offspring. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2018.
- Agre P. Aquaporin water channels (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl.* 43:4278-90, 2004.
- Arrighi S, Aralla M, Genovese P, Picabea N, Bielli A. Undernutrition during fetal to prepubertal life affects aquaporin 9 but not aquaporins 1 and 2 expression in the male genital tract of adult rats. *Theriogenology.* 74:1661-9, 2010.
- Antiwi S. Malnutrition: Missed Opportunities for Diagnosis. *Ghana Med J.* 42:101-104, 2008.
- Atsuta Y, Tadokoro R, Saito D, Takahashi Y. Transgenesis of the Wolffian duct visualizes dynamic behavior of cells undergoing tubulogenesis *in vivo*. *Dev Growth Differ.* 55: 579-90, 2013.
- Badran H H, Hermo L S. Expression and regulation of aquaporins 1, 8, and 9 in the testis, efferent ducts, and epididymis of adult rats and during postnatal development. *J Androl.* 23:358-73, 2002.
- Bale T L, Baram T Z, Brown A S, Goldstein J M, Insel T R, McCarthy M M, Nemeroff C B, Reyes T M, Simerly R B, Susser E S, Nestler E J. Early life programming and neurodevelopmental disorders. *Biol Psychiatry.* 68:314–319, 2010.
- Barker D J. The origins of the developmental origins theory. *J. Intern. Med.* 261:412-7, 2007.
- Barker D J P. The developmental origins of adult disease. *European Journal of Epidemiology.* 18:733-736, 2003.
- Barker DJ, Eriksson JG, Forsén T, Osmond C. Fetal origins of adult disease: strength of effects and biological basis. *Int J Epidemiol.* 2002.
- Barker D J P, Hales C N, Fall C H D, Osmond C, Phipps K, Clarck P M S. Type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidemia (syndrome X): Relation to reduced fetal growth. *Diabetologia.* 36:62-67, 1993.
- Barker D J P, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth M E J. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ.* 298:564-567, 1989.
- Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F, Schoenle EJ. A WNT4 mutation associated with Müllerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med.* 2004.
- Bennis-Taleb N, Remacle C, Hoet J J, Reusens B. A low-protein isocaloric diet during gestation affects brain development and alters permanently cerebral cortex blood vessels in rat offspring. *J Nutr.* 129:1613-9, 1999.
- Boivin J. *et al.*, International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Human reproduction (Oxford, England)*, 22(6), pp.1506–12, 2007.
- Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 07. ISSN 0003-2697. 1976
- Brameld J M, Buttery P J, Dawson J M, Harper J M. Nutritional and hormonal control of skeletal-mucle cell growth and differentiation. *Proc Nutr Soc.* 57:107-117, 1998.
- Burns S P, Desai M, Cohen R D, Hales C N, Iles R A, Germain J P, Going T C, Bailey R A. Gluconeogenesis, glucose handling, and structural changes in livers of the adult offspring of rats partially deprived of protein during pregnancy and lactation. *J Clin Invest.* 100:1768-74, 1997.
- Carroll T J, Park J S, Hayashi S, Majumdar A, McMahon A P. Wnt9b plays a central role in the regulation of mesenchymal to epithelial transitions underlying organogenesis of the mammalian urogenital system. *Dev Cell.* 9: 283-92, 2005.

- Cavariani MM, de Mello Santos T, Pereira DN, de Almeida Chuffa LG, Felipe Pinheiro PF, Scarano WR, Domeniconi RF. Maternal protein restriction differentially alters the expression of AQP1, AQP9 and VEGFr-2 in the epididymis of rat offspring. *Int J Mol Sci*. 2019.
- Chmurzynska A. Fetal programming: link between early nutrition, DNA methylation, and complex diseases. *Nutrition Reviews*. 68:87-98, 2010.
- Cohen J, Ooms M P, Vreeburg J T. Reduction of fertilizing capacity of epididymal spermatozoa by 5 $\alpha$ -steroid reductase inhibitors. *Experientia* 37:1031–1032, 1981.
- Collins P, Webb C. Estrogen hits the surface. *Nat Med*. 1999.
- Colombelli, K.T, Santos, S.A, Camargo, A.C, Constantino, F.B, Barquilha, C.N, Rinaldi, J.C, Felisbino, S.L, Justulin, L.A. Impairment Of Microvascular Angiogenesis Is Associated With Delay In Prostatic Development In Rat Offspring Of Maternal Protein Malnutrition. *Gen Comp Endocrinol*. May, 2017.
- Cornwall G A. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod.*, 15: 213-227, 2009.
- Cosentino M J, Cockett A T.K. Structure and Function of the Epididymis. *Urological Research*, v. 14, n. 5, p. 229-240, ISSN 0300-5623, 1986.
- Crossland R F, Balasa A, Ramakrishnan R, Mahadevan S K, Fiorotto M L, Van den Veyver I B. Chronic Maternal Low-Protein Diet in Mice Affects Anxiety, Night-Time Energy Expenditure and Sleep Patterns, but Not Circadian Rhythm in Male Offspring. *PLoS One*. 2018.
- Da Silva N. *et al*. Segmental and cellular expression of aquaporins in the male excurrent duct. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1758:1025-1033, 2006.
- Dahri S, Snoeck A, Reusens-Billen B, Remacle C, Hoet J J. Islet function in offspring of mothers on low-protein diet during gestation. *Diabetes*. 40:115-20, 1991.
- Dacheux J L, Castella S, Gatti J L, Dacheux F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology*. 63(5):219-341, 2005.
- De Mello Santos, T e Hinton, B T. We, the developing rete testis, efferent ducts and Wolffian duct all hereby agree that we need to connect. *Andrology*. 2019.
- De Miguel M P, Mariño J M, Martínez-García F, Nistal M, Paniagua R, Regadera J. Pre- and post-natal growth of the human ductus epididymidis. A morphometric study. *Reprod Fertil Dev*. 10(3):271-7, 1998.
- Domeniconi R. F. *et al*. Is the Epididymis a Series of Organs Placed Side By Side? *Biology of Reproduction* 95(1):10, 1–8, 2016.
- Domeniconi R F. *et al*. Immunolocalization of aquaporins 1, 2 and 7 in rete testis, efferent ducts, epididymis and vas deferens of adult dog. *Cell Tissue Res*. 332:329-35, 2008.
- Donjacour A A, Thomson A A, Cunha G R. FGF-10 plays an essential role in the growth of the fetal prostate. *Dev Biol*. 261: 39-54, 2003.
- Drake A J, Walker B R. The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *J. Endocrinol*. 180:1–16, 2004.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones P A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 2004.
- Eloumi-Mseddi J, Jemel-Oualha I, Beji A, Hakim B, Aifa S. Effect of estradiol and clomiphene citrate on Erk activation in breast cancer cells. *J Recept Signal Transduct Res*. 2015.
- Esteves S C, Miyaoka R & Agarwal A. An update on the clinical assessment of the infertile male. *Clinics*, 66(4), pp.691–700, 2011.

- Faure C, Dupont C, Chavatte-Palmer P, Gautier B, Levy R; ALIFERT Collaborative Group. Are semen parameters related to birth weight? *Fertil Steril*. 103(1):6-10, 2015.
- Fleming T P, Watkins J A, Sun C, Velazquez M A, Smyth N R, Eckert J J. Do little embryos make big decisions? How maternal dietary protein restriction can permanently change an embryo's potential, affecting adult health. *Reproduction, Fertility and Development*. 27:684–692, 2017.
- Fowden A L, Forhead A J. Endocrine regulation of feto-placental growth. *Horm Res*. 72:257-65, 2009.
- Gatti J L. *et al*. Post-testicular sperm environment and fertility. *Anim Reprod Sci*, v. 82-83, p. 321-39, Jul. ISSN 0378-4320, 2004.
- Gloyna R E, Wilson J D. A comparative study of the conversion of testosterone to 17- $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstane-3-one (dihydrotestosterone) by prostate and epididymis. *J Clin Endocrinol Metab* 29:970 – 977, 1969.
- Gluckman P D, Hanson M A. Maternal constraint of fetal growth and its consequences. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2004.
- Godfrey K M, Costello P M, Lillycrop K A. The developmental environment, epigenetic biomarkers and long-term health. *Jour of Develop Orig of Heal and Dis*. 1-8, 2015.
- Gould J M, Smith P J, Airey C J, Mort E J, Airey L E, Warricker F D M, Pearson-Farr J E, Weston E C, Gould P J W, Semmence O G, Restall K L, Watts J A, McHugh P C, Smith S J, Dewing J M, Fleming T P, Willaime-Morawek S. Mouse maternal protein restriction during preimplantation alone permanently alters brain neuron proportion and adult short-term memory. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018.
- Grissom N, Bowman N, Reyes T M. Epigenetic programming of reward function in offspring: a role for maternal diet. *Mamm Genome*. 25:41–48, 2014.
- Habib S, Zhang Q, Baum M. Prenatal programming of hypertension in the rat: Effect of postnatal rearing. *Nephron Extra*. 1:157-65, 2011.
- Hadziselimovic F. Involvement of Fibroblast Growth Factors and Their Receptors in Epididymo-Testicular Descent and Maldescent. *Mol Syndromol*. 2016.
- Hermo L, Schellenberg M, Liu L Y, Dayanandan B, Zhang T, Mandato C A, Smith C E. Membrane domain specificity in the spatial distribution of aquaporins 5, 7, 9, and 11 in efferent ducts and epididymis of rats. *J Histochem Cytochem*, 2008.
- Hermo L, Robaire B. Epididymal cell types and their functions. In: ROBAIRE B.; HINTON, B. T. (Ed.). *The Epididymis: from molecules to clinical practice*. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publisher, v.1, cap. 5, p.81-102, 2002.
- Hinton, B.T.; Avellar, M.C.W. *Wolffian Duct Development*; Second Edi.; Elsevier, 2018.
- Hinton B T, Galdamez M M, Sutherland A, Bomgardner D, Xu B, Abdel-Fattah R, Yang L. How do you get six meters of epididymis inside a human scrotum? *J Androl*. 32: 558-64, 2011.
- Hinton B T, Setchell B P. Fluid movement in the seminiferous tubules and the epididymal duct of the rat [proceedings]. *J Physiol*, 1993.
- Huang H F. *et al*. Function of aquaporins in female and male reproductive systems. *Hum Reprod Update*. 12:785-95, 2006.
- Hunter T. A tail of two src's: mutatis mutandis. *Cell*. Apr 10;49(1):1-4, 1987.
- Indrio F, Martini S, Francavilla R, Corvaglia L, Cristofori F, Mastrolia S A, Neu J, Rautava S, Russo Spina G, Raimondi F, Loverro G. Epigenetic Matters: The Link between Early Nutrition, Microbiome, and Long-term Health Development. *Front Pediatr*, 2017.

- Joseph A, Yao H, Hinton B T. Development and morphogenesis of the Wolffian/epididymal duct, more twists and turns. *Dev Biol.* 325: 6-14, 2009.
- Jost A. Recherches sur la différenciation sexuelle de l'embryon de Lapin. *Arch Anat Microsc Morphol Exp.* 36: 151-315, 1947.
- Kamel R M. Management of the infertile couple: an evidence-based protocol. *Reproductive biology and endocrinology* : RB&E, 8, p.21, 2010.
- Karner C M, Chirumamilla R, Aoki S, Igarashi P, Wallingford J B. Wnt9b signaling regulates planar cell polarity and kidney tubule morphogenesis. *Nat Genet.* 41: 793-9, 2009.
- Kitagaki J, Ueda Y, Chi X, Sharma N, Elder CM, *et al.* FGF8 is essential for formation of the ductal system in the male reproductive tract. *Development.* 138: 5369-78, 2011.
- Krapf D, Ruan Y C, Wertheimer E V, Battistone M A, Pawlak J B, Sanjay A, Pilder SH, Cuasnicu P, Breton S, Visconti P E. cSrc is necessary for epididymal development and is incorporated into sperm during epididymal transit. *Dev Biol.* 369:43-53, 2012.
- Krutsikh A, De Gendt K, Sharp V, Verhoeven G, Poutanen M, Huhtaniemi I. Targeted inactivation of the androgen receptor gene in murine proximal epididymis causes epithelial hypotrophy and obstructive azoospermia. *Endocrinology.* 2011.
- Kumar M, Tanwar P S. Canonical Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Regulates Postnatal Mouse Epididymal Development but Does Not Affect Epithelial Cell Differentiation. *Endocrinology.* Dec 1;158(12):4286-4299, 2017.
- Kumar M, Syed S M, Taketo M M, Tanwar P S. Epithelial Wnt/ $\beta$ catenin signalling is essential for epididymal coiling. *Dev Biol.* Apr 15;412(2):234-49, 2016.
- Langley-Evans S C, McMullen S. Developmental origins of adult disease. *Med Princ Pract.* 19:87-98, 2010.
- Lee H E, Ayarpadikannan S, Kim H S. Role of transposable elements in genomic rearrangement, evolution, gene regulation and epigenetics in primates. *Genes Genet Syst.*, 2015.
- Marsál K. Physiological adaptation of the growth-restricted fetus. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2018.
- Miyamoto T, Minase G, Shin T, Ueda H, Okada H, Sengoku K. Human male infertility and its genetic causes. *Reprod Med Biol.* 16(2):81-88, 2017.
- Moore K L, Persaud T V N. *Embriologia Básica.* Ed. Elsevier: 7ª Ed, Rio de Janeiro, p.376, 2008.
- Murashima A, Bingfang Xu B, Hinton B T. Understanding normal and abnormal development of the Wolffian/epididymal duct by using transgenic mice. *Asian J Androl.*, 2015.
- Murashima A, Miyagawa S, Ogino Y, Nishida-Fukuda H, Araki K. Essential roles of androgen signaling in Wolffian duct stabilization and epididymal cell differentiation. *Endocrinology* 2011.
- Oliveira CA, Carnes K, França LR, Hermo L, Hess RA. Aquaporin-1 and -9 are differentially regulated by oestrogen in the efferent ductule epithelium and initial segment of the epididymis. *Biol Cell.* Jun;97(6):385-95, 2005.
- Okazawa M, Murashima A, Harada M, Nakagata N, Noguchi M, Morimoto M, Kimura T, Ornitz DM, Yamada G. Region-specific regulation of cell proliferation by FGF receptor signaling during the Wolffian duct development. *Dev Biol.* 2015.
- Ornitz D M, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2001.
- Pastor-Soler N. Aquaporin 9 expression along the male reproductive tract. *Biol Reprod.* 65:384-93, 2001.



- Parsons S J, Parsons J T. Src family kinases, key regulators of signal transduction. *Oncogene*. 18;23(48):7906-9. Review, 2004.
- Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rohde W, Dörner G. Hypothalamic nuclei are malformed in weanling offspring of low protein malnourished rat dams. *J Nutrition*. 130:2582-9, 2001.
- Preston G M, Agre P. Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 15;88(24):11110-4, 1991.
- Qasem R J, Yablonski E, Li J, Tang H M, Pontiggia L, D'mello A P. Elucidation of thrifty features in adult rats exposed to protein restriction during gestation and lactation. *Physiol Behav*. 105:1182-93, 2012.
- Ramos C da F, Babinski M A, Costa W S, Sampaio F J The prostate of weaned pups is altered by maternal malnutrition during lactation in rats. *Asian J Androl*. 12:180-5, 2010.
- Rinaldi J C, Justulin L A Jr, Lacorte L M, Sarobo C, Boer P A, Scarano W R, Felisbino S L. Implications of intrauterine protein malnutrition on prostate growth, maturation and aging. *Life Science*. 92:763-4, 2013.
- Robaire B, Hinton BT, Orgebin-Crist MC. The epididymis. In: *The physiology of reproduction*. Knobil E., Neill J.D eds. Elsevier: 3rd Ed, New York:1071-1148, 2006.
- Robaire B, Hinton B T. The Epididymis. From Molecules to Clinical Practice. KluwerAcademic/Plenum Publishers; New York: 2002.
- Robaire B, Hermo L. Efferent ducts, epididymis, and vas deferens structure, functions, and their regulation. In: KNOBIL, E., NEILL, J.D. *The Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press., 23:999-1080, 1988.
- Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacological Research* 66:2, 105-143, 2012.
- Saxen, L. Organogenesis of the Kidney. Cambridge University Press. 1987.
- Santos S A A, Camargo A C, Constantino F B, Colombelli K T, Mani F, Rinaldi J C, Franco S, Portela L M F, Duran B O S, Scarano W R, Hinton B T, Felisbino S L, Justulin L A. Maternal Low Protein Diet Impairs Prostate Growth in Young Rat Offspring and Induces Prostate Carcinogenesis with Aging. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2018.
- Santos A M, Ferraz M R, Teixeira C V, Sampaio F J, da Fonte Ramos C. Effects of undernutrition on serum and testicular testosterone levels and sexual function in adult rats. *Horm Metab Res*. 36:27-33, 2004.
- Schimming B C. *et al*. Immunolocalization of Aquaporins 1 and 9 in the Ram Efferent Ducts and Epididymis. *Reprod Domest Anim*, 50:617-24, 2015.
- Setchell B P, Maddocks S, Brooks D E. Anatomy, vasculature, innervation, and fluids of the male reproductive tract. In: *The physiology of reproduction*. Knobil E., Neill J.D. eds. *Raven Press*. 8:1063-1147, 1994.
- Shaw G, Renfree M B. Wolffian duct development. *Sex Dev. Review* 8(5):273-80, 2014.
- Shima Y, Miyabayashi K, Haraguchi S, Arakawa T, Otake H, *et al*. Contribution of Leydig and Sertoli cells to testosterone production in mouse fetal testes. *Mol Endocrinol*. 27: 63-73, 2013.
- Skinner M K, Manikkam M, Guerrero-Bosagna C. Epigenetic transgenerational actions of environmental factors in disease etiology. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 2010.
- Sosa-Larios T C, Milliar-Garcia A, Reyes-Castro L A, Morimoto S, Jaramillo-Flores M E. Alterations in lipid metabolism due to a protein-restricted diet in rats during gestation and/or lactation. *Food Funct*. 2017.
- Snyder E M, Small C L, Bomgardner D, Xu B, Evanoff R, Griswold M D, Hinton B T. Gene expression in the efferent ducts, epididymis, and vas deferens during embryonic development of the mouse. *Dev Dyn*. 239:2479-91, 2010.

- Staack A, Donjacour AA, Brody J, Cunha GR, Carroll P. Mouse urogenital development: a practical approach. *Differentiation*. 71: 402-13, 2003.
- Sullivan R. Male fertility markers, myth or reality. *Anim Reprod Sci*. 82-83:341-7, 2004.
- Rodríguez C, Kirby J, Hinton B. The development of the epididymis. *The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice*, eds Robaire B, Hinton B (Kluwer Academic/ Plenum, New York), pp 251–267, 2002.
- Rodríguez-González G L, Viguera-Villaseñor R M, Millán S, Moran N, Trejo R, Nathanielsz F, Larrea, Zambrano E. Maternal protein restriction in pregnancy and/or lactation affects seminiferous tubule organization in male rat offspring. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*. 3:321-326, 2012.
- Rodríguez-González GL, Reyes-Castro LA, Vega CC, Boeck L, Ibáñez C, Nathanielsz PW, Larrea F, Zambrano E. Accelerated aging of reproductive capacity in male rat offspring of protein-restricted mothers is associated with increased testicular and sperm oxidative stress. *Age (Dordr)*. 2014.
- Tanwar P S, Kaneko-Tarui T, Zhang L, Rani P, Taketo M M, Teixeira J. Constitutive WNT/beta-catenin signaling in murine Sertoli cells disrupts their differentiation and ability to support spermatogenesis. *Biol Reprod*. Feb;82(2):422-32, 2010.
- Teixeira C V, Silandre D, de Souza Santos A M, Delalande C, Sampaio F J, Carreau S, da Fonte Ramos C. Effects of maternal undernutrition during lactation on aromatase, estrogen, and androgen receptors expression in rat testis at weaning. *J Endocrinol*. 192:301-11, 2007.
- Teixeira G R. *et al*. The expression of aquaporins 1 and 9 in adult rat epididymis is perturbed by chronic exposure to ethanol. *Tissue & Cell*. 44:47-53, 2012.
- Toledo F C, Perobelli J E, Pedrosa F P, Anselmo-Franci J A, Kempinas W D. In utero protein restriction causes growth delay and alters sperm parameters in adult male rats. *Reprod Biol Endocrinol*. 24;9:94, 2011.
- Tong SY, Hutson JM, Watts LM. Does testosterone diffuse down the Wolffian duct during sexual differentiation? *J Urol*. 155:2057-97,1996.
- Thomas S M, Brugge J S. Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13:513-609, 1997.
- Verkman AS, Mitra AK. Structure and function of aquaporin water channels. *Am J Physiol Renal Physiol*. Jan;278(1):F13-28. Review, 2000.
- Xu B, Washington AM, Hinton BT. Initial Segment Differentiation Begins During a Critical Window and Is Dependent upon Lumicrine Factors and SRC Proto-Oncogene (SRC) in the Mouse. *Biol Reprod*. Jul;95(1):15, 2016.
- Xu B, Washington A M, Hinton B T. PTEN signaling through RAF1 proto-oncogene serine/threonine kinase (RAF1)/ERK in the epididymis is essential for male fertility. *Proc Natl Acad Sci*. 111: 18643-8, 2014.
- Xu B, Yang L, Hinton B T. The role of fibroblast growth factor receptor substrate 2 (FRS2) in the regulation of two activity levels of the components of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway in the mouse epididymis. *Biology of reproduction*. 48:1–13, 2013.
- Xu B, Abdel-Fattah R, Yang L, Crenshaw S A, Black M B, Hinton B T. Testicular lumicrine factors regulate ERK, STAT, and NFKB pathways in the initial segment of the rat epididymis to prevent apoptosis. *Biol Reprod*. 84:1282–1291, 2011.
- Xu B, Yang L, Lye R J, Hinton B T. p-MAPK1/3 and DUSP6 regulate epididymal cell proliferation and survival in a region-specific manner in mice. *Biol Reprod*. 83:807-17, 2010.
- Yamane T, Konno R, Iwatsuki K, Oishi Y. Protein-restricted maternal diet during lactation decreases type I and type III tropocollagen synthesis in the skin of mice offspring. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2018.

Yeung C H, Sonnenberg-Riethmacher E, Cooper T G. Receptor tyrosine kinase c-ros knockout mice as a model for the study of epididymal regulation of sperm function. *J Reprod Fertil Suppl.* 53:137-47, 1998.

Zambrano E, Rodríguez-González GL, Guzmán C, García-Becerra R, Boeck L, Díaz L, Menjivar M, Larrea F, Nathanielsz PW. A maternal low protein diet during pregnancy and lactation in the rat impairs male reproductive development. *J Physiol.*;563:275-284, 2005.

Welsh M, Sharpe R M, Walker M, Smith L B, Saunders P T. New insights into the role of androgens in Wolffian duct stabilization in male and female rodents. *Endocrinology* 150: 2472-80, 2009.

Winship AL, Gazzard SE, Cullen-McEwen LA, Bertram JF, Hutt KJ. Maternal low-protein diet programmes low ovarian reserve in offspring. *Reproduction.* 2018.

Wong CW, McNally C, Nickbarg E, Komm BS, Cheskis BJ. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002.

Wu W, Shen O, Qin Y, Niu X, Lu C, Xia Y, Song L, Wang S, Wang X. Idiopathic male infertility is strongly associated with aberrant promoter methylation of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *PLoS One.* 2010