

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 19/07/2021.

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

RESUMO	11
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	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
CAPÍTULOS	37
CAPÍTULO I	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
CAPÍTULO II	68
Maternal Protein Restriction Modulates Angiogenesis and AQP9 Expression leading to a Delay in Postnatal Epididymal Development in Rat	Erro! Indicador não definido.
Abstract	Erro! Indicador não definido.
1. Introduction.....	Erro! Indicador não definido.
2. Material And Methods.....	Erro! Indicador não definido.
3. Results	Erro! Indicador não definido.
4. Discussion.....	Erro! Indicador não definido.
5. Conclusion	Erro! Indicador não definido.
REFERENCES	Erro! Indicador não definido.
CAPÍTULO III	94
Dieta Materna de Baixa Proteína modula ERK/Src e Wnt9b nas fases iniciais do desenvolvimento epididimário na prole masculina de ratos Wistar.	95

CONCLUSÕES.....	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	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 α , ER β , 5 α -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 α , ER β , P450 e
29 VEGFa e diminuição de AR, 5 α -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 α , 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 α , ER β , 5 α -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 α , ER β , P450
26 and VEGF α protein levels and a reduction in the AR, 5 α -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 α , 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

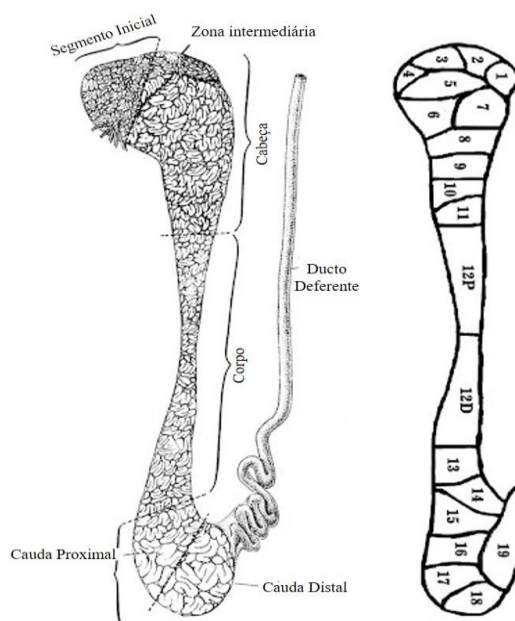
165

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).

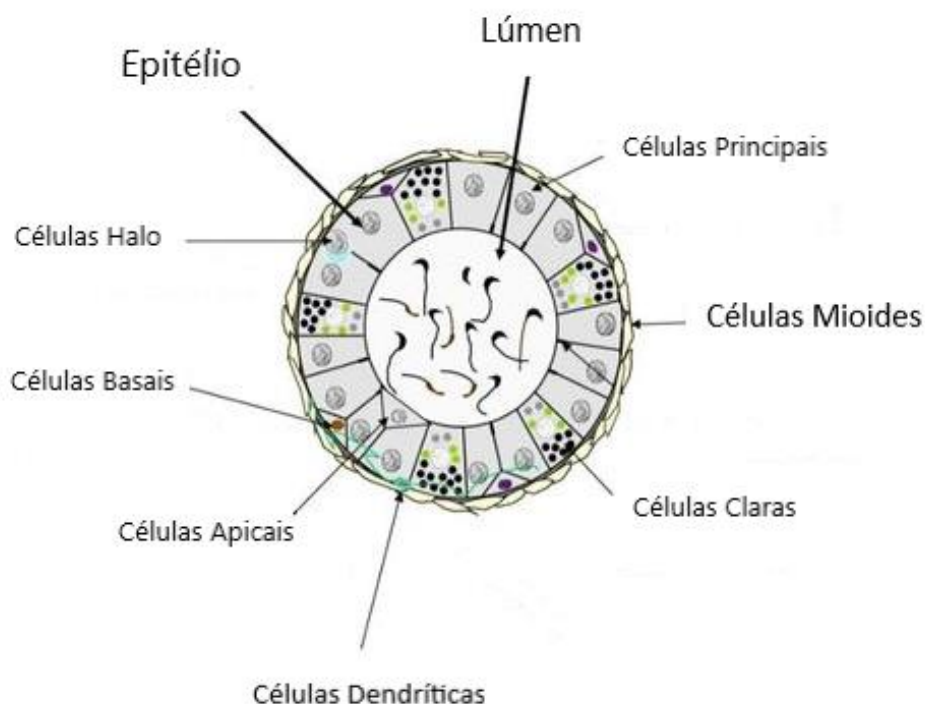
210 As células principais constituem 80% do epitélio epididimário e são responsáveis
211 pela maior parte das proteínas que são secretadas no lúmen. A contribuição destas células
212 para o estabelecimento de um ambiente luminal ácido é complexa e depende de diferentes
213 mecanismos. Por exemplo: no 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).

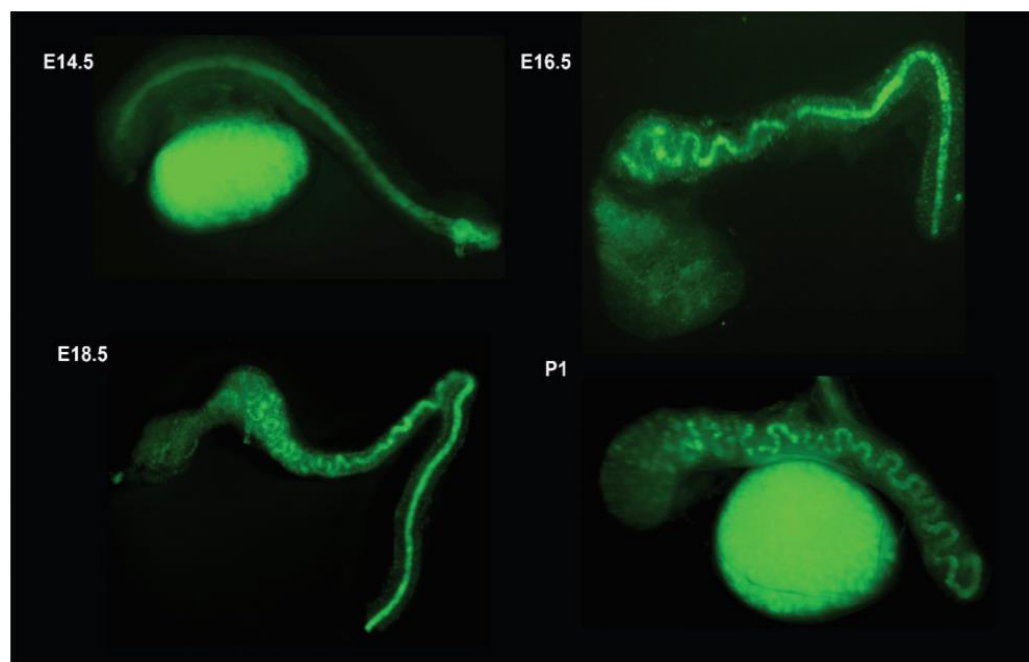
288 À medida que as células mesenquimais migram em direção à cloaca, elas induzem
289 o mesênquima adjacente a formar túbulos epiteliais em forma de S ou J, os quais são
290 chamados de túbulos mesonéfricos. Entretanto, muitos regredem e os poucos que
291 permanecem, aqueles que se encontram mais cranialmente 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).

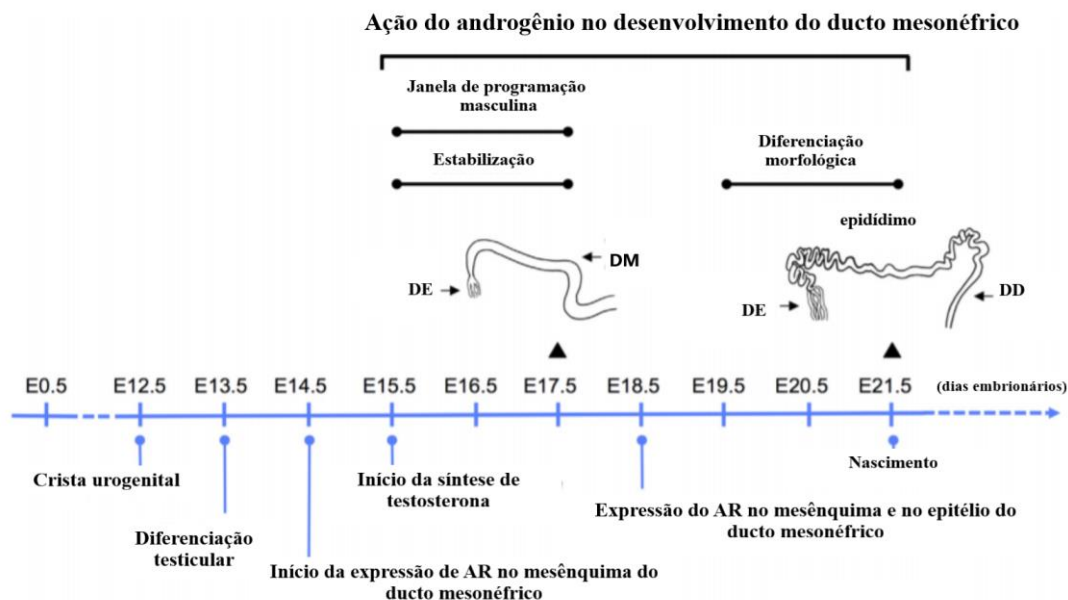
343 A testosterona, mas não a DHT, é responsável por orquestrar o desenvolvimento do
344 ducto mesonéfrico. Pacientes com deficiência de 5-alfa-redutase mostraram ter o
345 desenvolvimento epididimário pré-natal normal, e de fato, a DHT não está presente no
346 ducto até o nascimento do indivíduo (Fig.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

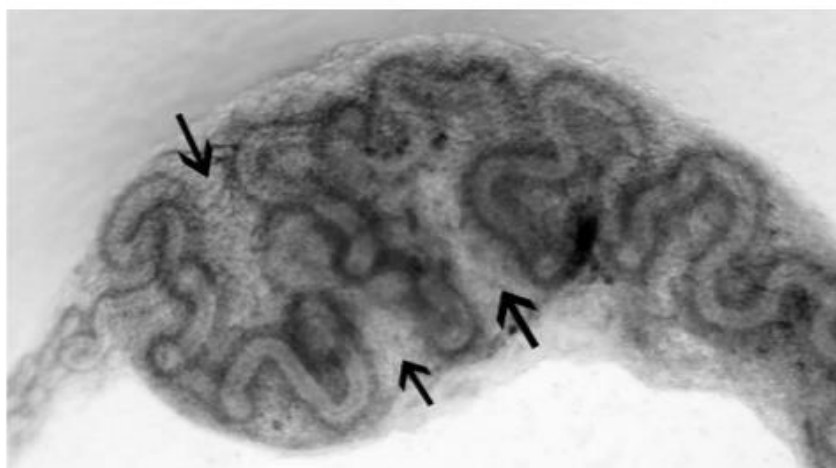
361



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

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 α -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- α -hydroxy-5- α -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 Spena 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/ β -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/ β 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