

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/03/2020.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



**Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Biociências de Botucatu**

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

Alexandre Dorth de Andrade

Regulação da expressão de genes da família *Wfdc* (*Whey-acidic protein four disulfide core*) por estímulo inflamatório no epidídimo de camundongos: potenciais funções imunológicas e reprodutivas

**Botucatu-SP
2019**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



**Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Instituto de Biociências de Botucatu**

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia

Alexandre Dorth de Andrade

Regulação da expressão de genes da família *Wfdc* (*Whey-acidic protein four disulfide core*) por estímulo inflamatório no epidídimo de camundongos: potenciais funções imunológicas e reprodutivas

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

Candidato: Alexandre Dorth de Andrade

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

**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: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Andrade, Alexandre Dorth de.

Regulação da expressão de genes da família Wfdc (Whey-acidic protein four disulfide core) por estímulo inflamatório no epidídimo de camundongos : potenciais funções imunológicas e reprodutivas / Alexandre Dorth de Andrade. - Botucatu, 2019

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

Orientador: Erick José Ramo da Silva

Capes: 21000000

1. Epidídimo - Doenças. 2. Epididimite. 3. Inflamação. 4. Camundongo como animal de laboratório. 5. Expressão gênica.

Palavras-chave: Epididimite; Epidídimo; Farmacologia; LPS; Wfdc.

Auxílio Financeiro

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
(processos 2015/08227-0; 2017/20102-3)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por guiar meu caminho e por sempre me dar muito mais do que imaginei.

Agradeço a minha mãe Diva Dorth de Andrade e meu pai Marcio Alexandre de Andrade por apoiarem minhas escolhas e sempre estarem do meu lado me acalmando nos momentos de angústia. Agradeço por fazerem o possível e o impossível por mim. Agradeço todos os dias a Deus pela honra de ser filho de vocês.

Agradeço a todos meus familiares (avós, tios e primos), em especial agradeço aos meus avós maternos (Maria Aparecida de Carvalho Dorth e José de Sousa Dorth) e aos meus avós paternos (Leonor Martos de Andrade e Francisco de Andrade – meu coração dói todos os dias pela saudade que sinto de vocês).

Agradeço a minha namorada Thainá Omia Bueno Pereira pela paciência, pela preocupação e cuidado, pelo apoio, pelo companheirismo e por estar ao meu lado nos momentos de alegria e nos momentos de tristeza. Muito obrigado meu amor.

Agradeço aos meus amigos de laboratório Noemia Aparecida Partelli Mariani, Alan Andrew dos Santos Silva, Priscila Gasperini Camolesi de Almeida, Leonardo Rokita de Rosa, Renan Minin de Mori, Juliana de Jesus Andrade, Tamiris Rocha Fanti Raimundo e André Mueller que me ajudaram ao longo do mestrado e me proporcionaram excelentes momentos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva por acreditar em mim até mesmo nos momentos em que nem eu mais acreditava, por entender minhas dificuldades e sempre se propor em me ajudar a superá-las, pelos ensinamentos profissionais e pessoais. Muito obrigado por mostrar que sempre podemos melhorar e que nunca estamos sozinhos. O senhor é um profissional e uma pessoa fantástica.

Agradeço ao Prof. Dr. André Luis Filadelpho por todos os ensinamentos e apoio para o início do projeto.

Agradeço a Profa. Dra. Maria Christina Werneck Avellar e sua aluna Geanne Arantes Freitas pela colaboração e aprendizado desenvolvido na UNIFESP.

Agradeço a Profa. Dra. Maria Angélica Spadella pela colaboração e aprendizado desenvolvido na FAMEMA.

Agradeço aos Prof. Dr. Luiz Gustavo de Almeida Chuffa por permitir o uso do microscópio para análise dos experimentos de morfologia.

Agradeço aos professores do Departamento de Farmacologia do Instituto de Biotecnologias da Unesp/Botucatu, Prof. Dr. André Sampaio Pupo, Prof. Dr. Carlos Alan Candido

Dias Junior, Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi, Profa. Dra. Márcia Gallacci e Profa. Dra. Valeria Cristina Sandrim que contribuíram grandemente para a minha formação.

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

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

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

Agradeço a Capes e a Fapesp (processos 2015/08227-0; 2017/20102-3) pelo apoio da bolsa de estudo e auxílio financeiro para o desenvolvimento desse projeto.

“O temor do Senhor é o princípio da sabedoria, e o conhecimento do Santo é prudência. Porque por mim se multiplicam os teus dias, e anos de vida se te acrescentarão. Se és sábio, para ti mesmo o és; se és escarnekedor, tu só o suportarás.”

Bíblia Sagrada (Provérbios 9: 10-12)

RESUMO

O epidídimo é responsável por transformar os espermatozoides imaturos em células funcionalmente competentes, capazes de adquirir motilidade progressiva e de reconhecer e fertilizar o oócito. Além disso, o epidídimo é primordial para proteger e armazenar o gameta masculino antes da ejaculação. Alterações da fisiologia epididimária podem afetar a sua função, causando infertilidade masculina. A inflamação do epidídimo, conhecida como epididimite, é uma das doenças mais prevalentes do trato urogenital masculino, sendo um fator relevante de infertilidade masculina. Sua principal etiologia envolve a invasão de bactérias, como *Escherichia coli*, via ascensão retrógrada pela uretra. O epidídimo expressa constitutivamente diversos componentes do sistema imunológico inato, incluindo os receptores do tipo Toll (TLRs), como o TLR4, que é ativado pelo lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas, além de proteínas com atividade antimicrobiana, como os inibidores da protease do tipo WFDC (*Whey-acidic protein four disulfide core*), indicando que este órgão está em constante estado de alerta para combater infecções bacterianas. Além da ação antimicrobiana e inibidora de protease, as proteínas WFDC apresentam ação anti-inflamatória, imunomoduladora e sobre a função espermática, sendo proteínas multifuncionais no trato reprodutor masculino. Neste estudo, testamos a hipótese de que a expressão de genes *Wfdc* no epidídimo é modificada por estímulos inflamatórios, como parte da resposta tecidual à agressão e de mecanismos celulares de defesa. Para tal, caracterizamos dois modelos de indução de epididimite em camundongos induzida pelo LPS ultrapuro de *E. coli* via interstício do segmento inicial e ducto deferente, provocando assim, eventos inflamatórios nas regiões proximal e distal do epidídimo. Processamos o segmento inicial, para o primeiro modelo de epididimite, e a cauda do epidídimo, para o segundo modelo de epididimite, para investigação dos efeitos do LPS sobre a expressão de citocinas, por ensaios de RT-qPCR e multiplex, e para avaliação histopatológica. Nossos resultados mostram que o epidídimo responde rapidamente ao estímulo inflamatório, mas com padrão e intensidade diferentes para cada região do órgão, sendo o segmento inicial mais sensível ao LPS do que a cauda do epidídimo quanto ao aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias (IL1B, IL6, TNF e IFNG). Para a investigação do perfil de expressão dos genes *Wfdc* processamos o segmento inicial e a cauda do epidídimo para os ensaios de RT-PCR e qPCR. Nossos resultados mostram que a expressão dos genes *Wfdc* é alterada frente ao desafio infamatório nas diferentes regiões do epidídimo, e que sua expressão apresenta perfis diferentes para cada região estimulada. Observamos regulação negativa dos níveis de *Wfdc6a_v2*, *Wfdc7*, *Wfdc8*, *Wfdc11*, *Wfdc15b_v1-2* e *Wfdc16* no segmento inicial 6 h após a injeção intersticial de LPS, e de *Wfdc6a_v1*, *Wfdc6a_v2*, *Wfdc6b*, *Wfdc11*, *Wfdc15b_v1_v2* e *Wfdc16* na cauda do epidídimo 24 ou 72 h após a injeção intraductal de LPS. Por outro lado, observamos regulação

positiva da expressão dos transcritos *Wfdc2*, *Wfdc3*, *Wfdc4*, *Wfdc5*, *Wfdc6b*, *Wfdc10*, *Wfdc12*, *Wfdc15a* e *Wfdc15b_v1-2* no segmento inicial 24 e/ou 72 h após a injeção intersticial de LPS, enquanto apenas os níveis de *Wfdc2* e *Wfdc5* foram aumentados na cauda do epidídimo após a injeção intraductal de LPS no mesmo período. O tratamento dos animais com o inibidor do fator de transcrição NF- κ B PDTC (100 mg/kg, i.p.) 1 h antes da indução da epididimite pelo LPS revelou que o aumento da expressão de alguns transcritos *Wfdc*, incluindo *Wfdc2*, *Wfdc6b* e *Wfdc10* no segmento inicial e *Wfdc5*, na cauda do epidídimo foram dependentes da ativação deste fator de transcrição. Em conjunto, nossos resultados fornecem novas informações sobre como o epidídimo expressa os genes *Wfdc* frente ao desafio inflamatório e destacam os possíveis papéis da família *Wfdc* no combate da inflamação e manutenção da homeostase do epidídimo. Nossos resultados sugerem que proteínas WFDC podem ser exploradas como alvos terapêuticos adjuvantes para o tratamento da epididimite.

ABSTRACT

The epididymis is responsible for transforming immature sperm into functionally competent cells capable of acquiring progressive motility and recognizing and fertilizing the oocyte. In addition, the epididymis is paramount for protecting and storing the male gamete before ejaculation. Changes in epididymal physiology may affect sperm maturation, transport or storage, causing male infertility. Epididymal inflammation, known as epididymitis, is one of the most prevalent diseases of the male urogenital tract, being a relevant factor of male infertility. Its main etiology involves the invasion of bacteria, such as *E. coli*, through retrograde ascension through the urethra. The epididymis constitutively expresses several elements of the innate immune system, including Toll-like receptors (TLRs), like the TLR4, which is activated by the lipopolysaccharide (LPS) of Gram-negative bacteria, as well as proteins with antimicrobial activity, like the WFDC (Whey-acidic difulvide core)-type protease inhibitors, indicating that this organ is constantly alert to fight bacterial infections. In addition to antimicrobial and protease inhibitory activities, WFDC proteins show anti-inflammatory, immunomodulatory and reproductive functions, being multifunctional proteins in the male reproductive tract. In this study, we tested the hypothesis that *Wfdc* gene expression in the epididymis is modified by inflammatory stimuli as part of tissue defense mechanisms to microbial aggression. For that, we characterized two mouse models of epididymitis induction induced by ultrapure LPS from *E. coli* via interstitial of the initial segment and vas deferens, causing inflammatory events in the proximal and distal regions of the epididymis. We processed the initial segment, for the first epididymitis model, and cauda epididymis, for the second epididymitis model, to investigate the effects of LPS on cytokine expression by RT-qPCR and multiplex assays and for histopathological evaluation. Our results show that the epididymis rapidly responds to inflammatory stimuli, but with different patterns and intensity for each organ region, and the initial segment is more sensitive to LPS than the cauda epididymis to increased expression of pro-inflammatory cytokines (IL1B, IL6, TNF e IFNG). In order to investigate the expression profile of the *Wfdc* genes, we processed the initial segment and the cauda epididymis for the RT-PCR and qPCR assays. Our results show that the expression of *Wfdc* genes is modified by the inflammatory challenge in the epididymis in a region-specific fashion. We observed a negative regulation of the levels of *Wfdc6a_v2*, *Wfdc7*, *Wfdc8*, *Wfdc11*, *Wfdc15b_v1-2* and *Wfdc16* transcripts in the initial segment 6 h after interstitial LPS injection, and *Wfdc6a_v1*, *Wfdc6a_v2*, *Wfdc6b*, *Wfdc11*, *Wfdc15b_v1_v2* and *Wfdc16* in the cauda epididymis 24 or 72 h after intravasal LPS injection. On the other hand, we observed a positive regulation of *Wfdc2*, *Wfdc3*, *Wfdc4*, *Wfdc5*, *Wfdc6b*, *Wfdc10*, *Wfdc12*, *Wfdc15a* and *Wfdc15b_v1-2* transcripts in the initial segment 24 and/or 72 h after interstitial LPS injection, while only *Wfdc2* and *Wfdc5* transcripts were increased in the cauda epididymis after intravasal LPS injection at the same time-point. Treatment with PDTC (100 mg/kg, i.p.), an inhibitor of

NFKB transcription factor, 1 h before inducing epididymitis revealed that up-regulation of some *Wfdc* transcripts, including *Wfdc2*, *Wfdc6b* and *Wfdc10* in the initial segment and *Wfdc5* in the cauda epididymis were dependent on the activation of this transcription factor. Altogether, our results provide new information on how *Wfdc* gene expression is modulated in the epididymis during acute inflammation and highlight the possible roles of the *Wfdc* family in combating inflammation and restoring epididymis homeostasis. Our results suggest that WFDC proteins may be exploited as adjuvant therapeutic targets for the treatment of epididymitis.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

DHT: diidrotestosterona

AR: receptor de androgênios

PRRs: pattern recognition receptors, do inglês

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

TLRs: toll-like receptors, do inglês

PAMPs: pathogen-associated molecular patterns, do inglês

LPS: lipopolissacarídeo

LTA: ácido lipoteicoico

KDO: ácido 3-deoxi-D-mano-oct-2-ulosônico

LBP: proteína de ligação do LPS

CD14: cluster of differentiation 14, do inglês

MD2: myeloid differentiation protein 2, do inglês

MyD88: Myeloid differentiation protein 88, do inglês

NFKB: nuclear factor kappa B, do inglês

PDTC: ammonium pyrrolidinedithiocarbamate, do inglês

SUMÁRIO

Capítulo 1	13
INTRODUÇÃO.....	14
1. Epidídimo.....	14
2. Epididimite	19
3. Epidídimo e a imunidade inata	21
3.1 Receptores do tipo Toll (Toll-like receptors;TLRs)	21
3.2 Proteínas da família Whey-acidic protein four disulfide core (WFDC).....	24
OBJETIVOS	30
1. Objetivo geral.....	30
2. Objetivos específicos	30
Capítulo 2	31
Region-specific regulation of <i>Wfdc</i> gene expression in the mouse epididymis to intravasa and interstitial lipopolysaccharide-induced epididymitis.....	31
ABSTRACT	32
INTRODUCTION	32
MATERIAL AND METHODS.....	35
Animals	35
Experimental models of epididymitis	35
Histopathological evaluation	36
Reverse transcriptase (RT) reaction, conventional polymerase chain reaction (PCR) and real-time quantitative PCR (qPCR).....	36
Cytokine multiplex bead assay	38
Endotoxin concentration assay.....	39
Statistical Analysis.....	40
RESULTS	40
Acute inflammatory responses of the mouse initial segment and cauda epididymis to interstitial and intravasa LPS stimuli.	40
Macroscopic and histopathological analysis of the mouse epididymis upon interstitial and intravasa LPS-induced epididymitis	44
Endotoxin clearance kinetics from the initial segment and cauda epididymis upon interstitial and intravasa LPS injection	47
Basal expression profile of WFDC transcript in the mouse male reproductive tract	48
Effects of interstitial and intravasa LPS-induced epididymis on the expression of <i>Wfdc</i> genes	50
Impact of NF-kappa B inhibition on LPS-induced modulation of <i>Wfdc</i> genes in the inflamed epididymis	53
DISCUSSION	55
REFERENCES	59

SUPPLEMENTARY MATERIAL	64
Capítulo 3	74
Efeito da epididimite intersticial e intraductal induzida por LPS sobre a motilidade espermática: consequências para a função do espermatozoide	75
Materiais e métodos	76
Análise estatística	77
Resultados e Discussão	77
Capítulo 4	82
CONCLUSÃO	83
Referências Bibliográficas	84
Anexo	91

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1. Epidídimo

A espermatogênese é um processo contínuo de divisão e diferenciação celular que leva à produção diária de milhões de espermatozoides. Em mamíferos, o espermatozoide testicular recém-liberado na luz do túbulo seminífero, no entanto, é ainda funcionalmente imaturo, imóvel e incapaz de reconhecer e fertilizar o oócito. Essas características essenciais para a reprodução são adquiridas no processo de maturação espermática, que ocorre durante passagem dos espermatozoides pelo epidídimo, órgão acessório do sistema genital masculino formado por um ducto longo e altamente enovelado, que liga os ductos eferentes ao ducto deferente (Hinton & Robaire, 2015). Além de promover a maturação do gameta masculino, o epidídimo também é essencial para o seu transporte, concentração, armazenamento e proteção previamente à ejaculação (Turner, 2008; Cornwall, 2009).

Anatomicamente, o epidídimo está localizado no escroto, aplicado à margem posterior do testículo e conecta os ductos eferentes ao ducto deferente. Na idade adulta, o ducto epididimário, quando desenovelado, atinge aproximadamente 6 m no homem, 3 m no rato e 1 m no camundongo (Hinton & Robaire, 2015). O epidídimo apresenta quatro compartimentos principais: 1) luz tubular, que contém os espermatozoides banhados pelo fluido epididimário; 2) epitélio do tipo colunar pseudoestratificado, composto por diferentes tipos celulares cuja abundância varia ao longo do órgão; 3) camada de músculo liso, que envolve o epitélio e atua no transporte dos espermatozoides ao longo do órgão e na sua emissão, durante a ejaculação; e 4) interstício, que contém fibras nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos, além de fibroblastos e células imunológicas (Figura 1) (Robaire & Viger, 1995; Hinton & Robaire, 2015).

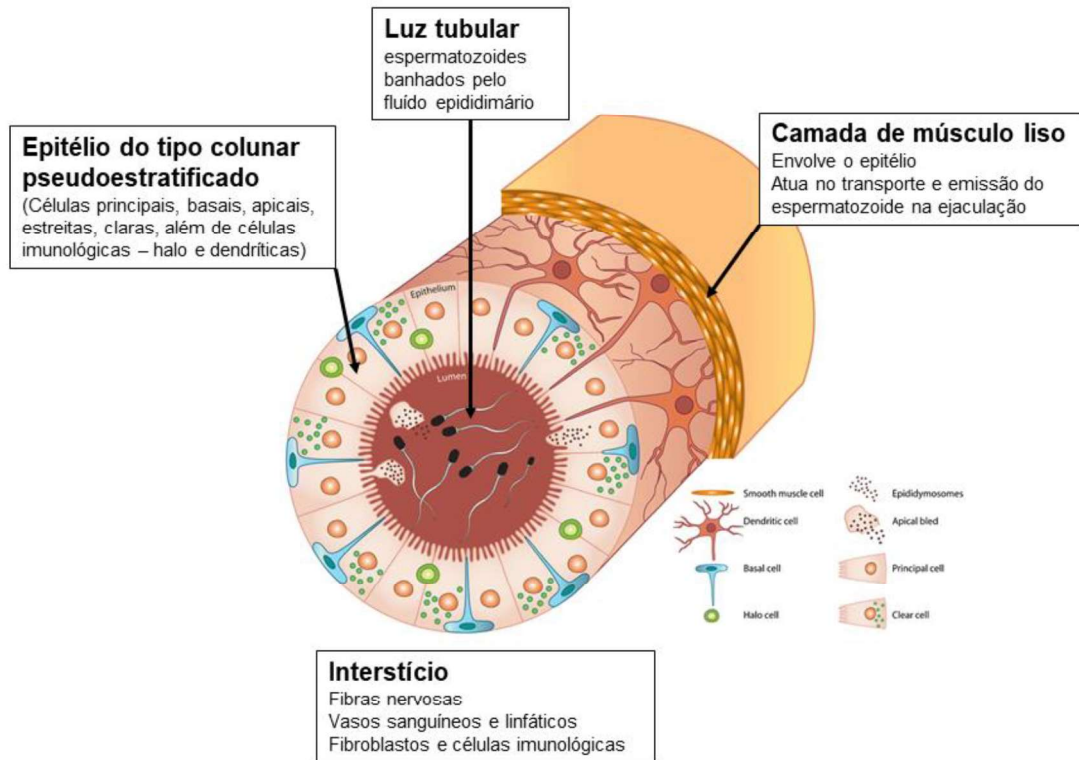


Figura 1: Representação esquemática de um corte transversal do ducto do epidídimo. Os tipos celulares do epitélio epididimário, bem como os compartimentos epitelial, luminal e muscular liso estão ilustrados. Adaptado de Belleannée et al. (2012).

O epidídimo pode ser dividido em diferentes regiões a partir de critérios anatômicos e morfológicos. Em roedores (ratos e camundongos), o epidídimo é dividido, da região proximal para distal, em segmento inicial, cabeça, corpo e cauda. Além disso, cada região do epidídimo pode ser subdividida em segmentos separados por septos intersticiais de tecido conjuntivo, apontando a presença de 10 e 19 segmentos no epidídimo de camundongos e ratos, respectivamente (Figura 2) (Jelinsky et al., 2007; Turner, 2008). A análise da expressão gênica por *microarray* revelou diferenças na expressão de uma série de genes entre os diferentes segmentos epididimários, fazendo com que a expressão de muitos genes apresente padrão diferencial de acordo com o segmento, ou ainda, seja restrita a alguns deles (Johnston et al., 2005; Jelinsky et al., 2007; Sipilä & Björkgren, 2016). Esse controle preciso e segmentado da expressão gênica no epidídimo influencia a atividade secretória e absorptiva do epitélio, gerando microambientes luminiais distintos entre seus diferentes segmentos, os quais

gradativamente interagem com os espermatozoides, promovendo sua maturação e culminando no seu armazenamento em estado quiescente nas porções distais desse órgão (Belleannée et al., 2012; Sipilä & Björkgren, 2016).

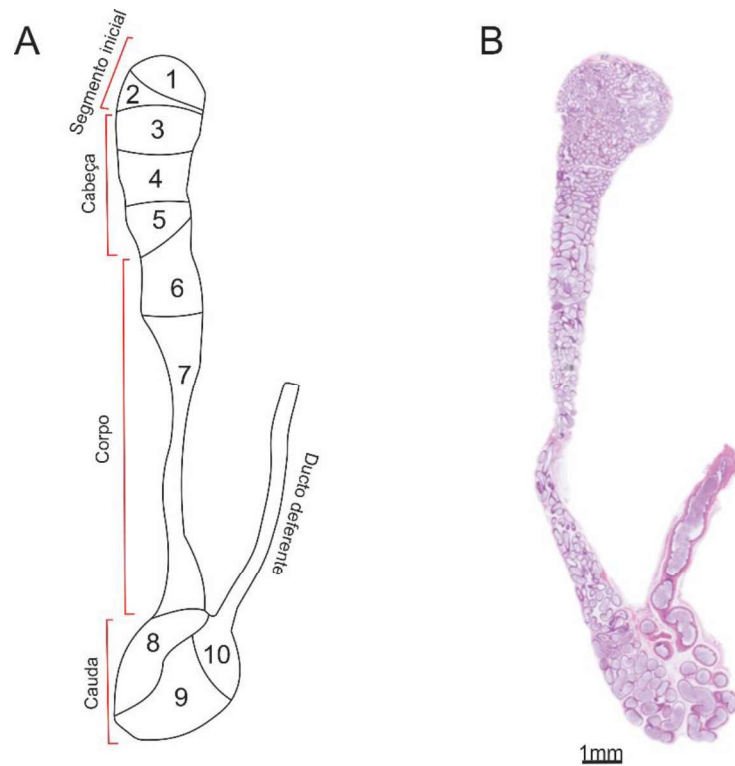


Figura 2: Anatomia do epidídimo de camundongo. (A) Representação esquemática do epidídimo de camundongo, indicando as principais regiões do epidídimo (segmento inicial, cabeça, corpo e cauda), e os 10 segmentos epididimários separados por septos de tecido conjuntivo. (B) Corte longitudinal do epidídimo corado com hematoxilina/eosina. Adaptado de Jelinsky et al. (2007) e Sullivan & Mieusset (2016).

O epitélio epididimário é formado por diversos tipos celulares, a saber: células principais e células basais, presentes em todas regiões epididimárias, células apicais e células estreitas, restritas ao segmento inicial e à zona intermediária (região de transição entre o segmento inicial e a cabeça do epidídimo), células claras, presentes na cabeça, corpo e cauda do epidídimo, além de células de origem imunológica, como as células halo e células dendríticas, cuja distribuição varia ao longo do órgão (Hinton & Robaire, 2015). A presença

de *junções estreitas* na porção luminal de células principais adjacentes forma a barreira hemato-epididimária, que é fundamental para a manutenção do microambiente luminal e proteção do espermatozoide em maturação (Hinton & Palladino, 1995; Mital et al., 2011; Avellar & Hinton, 2019). Essa distribuição diferencial das células epiteliais entre as regiões do epidídimo juntamente com o perfil segmentado de expressão gênica conferem grande complexidade estrutural e funcional a este órgão (Cornwall, 2009; Da Silva et al., 2011; Hinton & Robaire, 2015).

Vale destacar que os mecanismos moleculares, bioquímicos e celulares pelos quais o epidídimo exerce suas funções ainda permanecem pouco conhecidos. A importância de se investigar os processos epididimários responsáveis pela geração de espermatozoides competentes é enfatizada pelo fato de que quase metade dos casos de infertilidade masculina ainda não apresentam causas conhecidas, sendo que muitos podem estar associados a alterações durante a passagem dos espermatozoides pelo epidídimo (Turner, 2008; Cornwall, 2009).

Os gametas chegam ao epidídimo impulsionados pelo fluido testicular, pelo movimento ciliar dos ductos eferentes, que gera uma turbulência fluídica, e pela atividade contrátil da musculatura lisa, servindo como força motriz para impulsionar os espermatozoides para frente (Yuan et al., 2019). Durante o processo de maturação, o transporte de espermatozoides pelo epidídimo depende, sobretudo, das contrações da musculatura lisa ao redor do ducto epididimário (Avellar et al., 2019). Na maior parte das regiões do epidídimo essas contrações são rítmicas, com exceção da cauda do epidídimo, onde são esporádicas na ausência de estímulos específicos, como aqueles oriundos do sistema nervoso autônomo (Elfgen et al., 2018). Vale ressaltar, ainda, que tanto a espessura da camada muscular lisa que circunda as células epiteliais do epidídimo quanto a densidade da inervação autonômica aumentam do epidídimo proximal para o distal (Ricker, 1998).

As funções do epidídimo são reguladas por uma complexa rede de fatores hormonais, neuronais, testiculares e imunológicos. Os androgênios, sobretudo a testosterona e seu metabólito ativo diidrotestosterona (DHT), membros da família dos hormônios esteroides, são os principais promotores da diferenciação, morfologia e função do epidídimo (Patrão et al., 2009; Hamzeh & Robaire, 2010). Eles promovem seus efeitos a partir da interação com o receptor de androgênios (AR), membro da superfamília de receptores acoplados a fatores de transcrição, expresso pelas células epiteliais, intersticiais e da musculatura lisa ao longo do epidídimo (Patrão et al., 2009; O'Hara et al., 2011; Sipilä et al., 2011). Sabe-se que alterações na sinalização androgênios/AR tanto por mudanças nos níveis desses hormônios quanto na expressão/sinalização do AR podem afetar a estrutura, desenvolvimento e funções do epidídimo, resultando em infertilidade ou subfertilidade (Avellar & Hinton, 2019).

O impacto da interação entre o epidídimo e o sistema imunológico na fertilidade masculina tem atraído diversas pesquisas nas últimas décadas. O estabelecimento da tolerância imunológica acontece antes da geração do gameta maduro que, portanto, é considerado corpo estranho pelo sistema imunológico do indivíduo. Dessa forma, os espermatozoides são células autoantigênicas, capazes de induzir resposta autoimune e inflamatória se expostos ao ambiente extraluminal testicular e epididimário (Hedger & Hales, 2006). Entretanto, na luz dos túbulos seminíferos e do ducto epididimário os gametas masculinos são bem tolerados tanto durante a espermatogênese quanto na maturação epididimária, o que indica a existência de mecanismos de tolerância imunológica no testículo e epidídimo, protegendo o espermatozoide de ataques imunológicos (Hedger, 2011). O ambiente imunológico no testículo é relativamente bem estudado; do contrário, pouco se conhece sobre os mecanismos pelos quais o epidídimo protege o espermatozoide de um ataque autoimunitário (para revisão ver Hedger, 2011; Schagdarsurengin et al., 2016).

Paradoxalmente ao ambiente de tolerância imunológica do órgão, o epidídimo possui um vasto arsenal imunológico, composto por células imunitárias encontradas no epitélio, interstício, e algumas vezes na luz tubular, e pela expressão abundante e constitutiva de diversos elementos do sistema imunológico inato, como receptores de reconhecimento de

padrões (PRRs), citocinas, quimiocinas e proteínas antimicrobianas, incluindo membros da família da β -defensinas e dos inibidores de protease do tipo WFDC (*Whey-acidic protein four disulfide core*) (Clauss et al., 2002; O'rand et al., 2011; Ribeiro et al., 2016). Acredita-se que esse sistema esteja em constante estado de alerta para proteger os espermatozoides e o próprio tecido contra estímulos infecciosos e inflamatórios (Fijak et al., 2018).

É reconhecido que qualquer desequilíbrio entre eventos pró- e anti-inflamatórios no epidídimo pode comprometer a sua função e, conseqüentemente, a fertilidade. Embora uma proporção significativa dos casos de infertilidade masculina seja, de fato, atribuída a causas inflamatórias ou imunológicas (Hedger, 2011), os mecanismos celulares e moleculares básicos envolvidos na resposta do epidídimo em condições de inflamação ainda são pouco conhecidos (Avellar et al., 2019). Nesse ponto, vale destacar que doenças inflamatórias do epidídimo são altamente prevalentes em homens de todas as idades e importante fator etiológico de infertilidade masculina (Nicholson et al., 2010; Pilatz et al., 2015).

2. Epididimite

A inflamação é uma resposta biológica do tecido vascularizado contra estímulos nocivos de naturezas diversas, a qual envolve a produção e recrutamento de inúmeros mediadores humorais e celulares, que atuam de forma orquestrada visando combater o estímulo e restaurar a homeostasia do sistema. Nesse contexto, a inflamação do epidídimo, conhecida como epididimite, é um fator relevante para a perda de bem-estar e produtividade em homens de todas as idades (Tracy et al., 2008; Pilatz et al., 2015). Estudos epidemiológicos indicaram que a epididimite apresenta incidência anual de 250-650 casos/100000 homens no Reino Unido, sendo a condição inflamatória mais frequente do trato reprodutor masculino (Nickel et al., 2005; Nicholson et al., 2010). Trata-se do quinto diagnóstico urológico mais comum em homens com idades entre 18 e 50 anos, atingindo aproximadamente 600.000 casos por ano nos EUA (Tracy et al., 2008).

Fatores de risco para epididimite na maioria dos homens incluem: história de infecções do trato urinário ou infecções sexualmente transmissíveis, anormalidades anatômicas

(obstrução da saída da bexiga), além de cirurgias de próstata ou do trato urinário ou outros traumas escrotais (Taylor, 2015; McConaghy & Panchal, 2016). Dentre esses, infecções por bactérias, como *Chlamydia trachomatis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, compõem a etiologia mais comum de epididimite (Pilatz et al., 2015). Acredita-se que a principal rota de invasão bacteriana no epidídimo seja pela ascensão retrógrada via uretra/ducto deferente (Michel et al., 2015).

As lesões teciduais induzidas pela epididimite bacteriana, tipicamente observadas na cauda do epidídimo de homens e em modelos experimentais em roedores e lagomorfos, incluem infiltrado inflamatório intersticial, edema, destruição do epitélio, fibrose intersticial e obstrução do ducto epididimário (Hackett et al., 1988; Tanaka et al., 1995; Turner et al., 2011; Stammler et al., 2015; Michel et al., 2016; Silva et al., 2018). Além disso, observa-se mudança no perfil de expressão gênica ao longo do epidídimo, incluindo aumento ou diminuição da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória (citocinas, quimiocinas, cicloxigenases, NO sintases, etc.), variando de acordo com o tipo de estímulo inflamatório (Turner et al., 2011; Lang et al., 2014; Michel et al., 2016; Silva et al., 2018).

As alterações morfológicas e funcionais no epidídimo induzidas pela epididimite podem causar quadros de infertilidade ou subfertilidade temporária ou permanente (Michel et al., 2015). De fato, cerca de 40% dos pacientes diagnosticados com epididimite bacteriana apresentam alterações persistentes de parâmetros espermáticos, como oligospermia ou azospermia, mesmo meses após o tratamento adequado da doença com antibióticos e anti-inflamatórios e supressão dos sintomas (Eickhoff et al., 1999; Rusz et al., 2012). Além disso, 20% dos pacientes evoluem para quadros de epididimite recorrente ou crônica, associada a dor escrotal crônica, podendo exigir a remoção cirúrgica do epidídimo (Nickel et al., 2002). Dessa forma, o melhor conhecimento da fisiopatologia da epididimite contribuirá para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas visando a reversão dos seus efeitos nocivos e a preservação da fertilidade e bem-estar do homem.

Capítulo 4

CONCLUSÃO

No presente trabalho, demonstramos que o desafio inflamatório intersticial e intravascular com LPS induziu reação inflamatória aguda no segmento inicial e na cauda do epidídimo, caracterizada pela regulação diferencial da expressão de mediadores inflamatórios entre as regiões do epidídimo. Descobrimos uma resposta diferencial da expressão dos genes *Wfdc* nas diferentes regiões epididimárias frente ao desafio inflamatório, sendo está parcialmente dependente da ativação do NFκB. Essas alterações induzidas pelo LPS foram acompanhadas por um efeito negativo sobre a motilidade e parâmetros cinemáticos dos espermatozoides, conforme a via de injeção do LPS. Esses resultados sustentam nossa hipótese inicial e sugerem que os membros da família *Wfdc* podem exercer funções no epidídimo buscando combater o estímulo nocivo e restaurar a homeostasia do órgão.

Nossos dados também incitam novos estudos que busquem o melhor entendimento do papéis das proteínas WFDC na fisiopatologia da epididimite bacteriana, bem como a correlação entre seus níveis de expressão e a manutenção dos parâmetros de motilidade e de cinemática espermática.

Referências Bibliográficas

- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*, 124(4), 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Avellar, M. C. W., Ribeiro, C. M., Dias-da-Silva, M. R., & Silva, E. J. R. (2019). In search of new paradigms for epididymal health and disease: innate immunity, inflammatory mediators, and steroid hormones. *Andrology*, 0(0). <https://doi.org/10.1111/andr.12654>
- Avellar, Maria Christina W., & Hinton, B. T. (2019). Epididymis. In I. Huhtaniemi & L. Martini (Eds.), *Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)* (pp. 807–813). Oxford: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65180-2>
- Belleannée, C., Thimon, V., & Sullivan, R. (2012). Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell and Tissue Research*, 349(3), 717–731. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1381-0>
- Bhushan, S., Tchatalbachev, S., Klug, J., Fijak, M., Pineau, C., Chakraborty, T., & Meinhardt, A. (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* Block MyD88-Dependent and Activate MyD88-Independent Signaling Pathways in Rat Testicular Cells. *The Journal of Immunology*, 180(8), 5537. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5537>
- Bingle, C. D. (2011). Towards defining the complement of mammalian WFDC-domain-containing proteins. *Biochemical Society Transactions*, 39(5), 1393. <https://doi.org/10.1042/BST0391393>
- Bingle, C. D., & Vyakarnam, A. (2008). Novel innate immune functions of the whey acidic protein family. *Trends in Immunology*, 29(9), 444–453. <https://doi.org/10.1016/j.it.2008.07.001>
- Browne, J. A., Leir, S.-H., Eggener, S. E., & Harris, A. (2018). Region-specific innate antiviral responses of the human epididymis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 473, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.01.004>
- Chapman, J. L., Ojha, P., Gupta, R., Johnson, T. A., & Palladino, M. A. (2007). Members of the Toll-Like Receptor Family of Innate Immunity Pattern-Recognition Receptors Are Abundant in the Male Rat Reproductive Tract1. *Biology of Reproduction*, 76(6), 958–964. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059410>
- Clauss, A., Lilja, H., & Lundwall, A. (2002). A locus on human chromosome 20 contains several genes expressing protease inhibitor domains with homology to whey acidic protein. *The Biochemical Journal*, 368(Pt 1), 233–242. <https://doi.org/10.1042/BJ20020869>
- Clauss, A., Lilja, H., & Lundwall, A. (2005). The evolution of a genetic locus encoding small serine proteinase inhibitors. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 333(2), 383–389. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.05.125>
- Cornwall, G. A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human Reproduction Update*, 15(2), 213–227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn055>
- Da Silva, N., Cortez-Retamozo, V., Reinecker, H.-C., Wildgruber, M., Hill, E., Brown, D., et al. (2011). A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction (Cambridge, England)*, 141(5), 653–663. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0493>
- Eickhoff, Frimodt-Møller, Walter, & Frimodt-Møller. (1999). A double-blind, randomized, controlled multicentre study to compare the efficacy of ciprofloxacin with pivampicillin as oral therapy for epididymitis in men over 40 years of age. *BJU International*, 84(7), 827–834. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.1999.00252.x>
- Fijak, M., Bhushan, S., Michel, V., Nicolas, N., Meinhardt, A., Pilatz, A., et al. (2018). Infectious, inflammatory and ‘autoimmune’ male factor infertility: how do rodent models inform clinical

practice? *Human Reproduction Update*, 24(4), 416–441. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy009>

Fujita, Y., Mihara, T., Okazaki, T., Shitanaka, M., Kushino, R., Ikeda, C., et al. (2011). Toll-like receptors (TLR) 2 and 4 on human sperm recognize bacterial endotoxins and mediate apoptosis. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 26(10), 2799–2806. <https://doi.org/10.1093/humrep/der234>

Girling, J. E., & Hedger, M. P. (2007). Toll-like receptors in the gonads and reproductive tract: emerging roles in reproductive physiology and pathology. *Immunology & Cell Biology*, 85(6), 481–489. <https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100086>

Goodson, S. G., Zhang, Z., Tsuruta, J. K., Wang, W., & O'Brien, D. A. (2011). Classification of mouse sperm motility patterns using an automated multiclass support vector machines model. *Biology of Reproduction*, 84(6), 1207–1215. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088989>

Hackett, R. A., Huang, T. W., & Berger, R. E. (1988). Experimental escherichia coli epididymitis in rabbits. *Urology*, 32(3), 236–240. [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(88\)90391-3](https://doi.org/10.1016/0090-4295(88)90391-3)

Hagiwara, K., Kikuchi, T., Endo, Y., Huqun, Usui, K., Takahashi, M., et al. (2003). Mouse SWAM1 and SWAM2 Are Antibacterial Proteins Composed of a Single Whey Acidic Protein Motif. *The Journal of Immunology*, 170(4), 1973. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.4.1973>

HALL, S. H., HAMIL, K. G., & FRENCH, F. S. (2002). Host Defense Proteins of the Male Reproductive Tract. *Journal of Andrology*, 23(5), 585–597. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02295.x>

Hamzeh, M., & Robaire, B. (2010). Identification of Early Response Genes and Pathway Activated by Androgens in the Initial Segment and Caput Regions of the Regressed Rat Epididymis. *Endocrinology*, 151(9), 4504–4514. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0023>

Hedger, Mark P. (2011). Immunophysiology and Pathology of Inflammation in the Testis and Epididymis. *Journal of Andrology*, 32(6), 625–640. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.012989>

Hedger, M.P., & Hales, D. B. (2006). CHAPTER 25 - Immunophysiology of the Male Reproductive Tract. In J. D. Neill (Ed.), *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction (Third Edition)* (pp. 1195–1286). St Louis: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50030-0>

Hellström, I., Raycraft, J., Hayden-Ledbetter, M., Ledbetter, J. A., Schummer, M., McIntosh, M., et al. (2003). The HE4 (WFDC2) Protein Is a Biomarker for Ovarian Carcinoma. *Cancer Research*, 63(13), 3695.

Hiemstra, P. S., Maassen, R. J., Stolk, J., Heinzl-Wieland, R., Steffens, G. J., & Dijkman, J. H. (1996). Antibacterial activity of antileukoprotease. *Infection and Immunity*, 64(11), 4520–4524.

Hinton, B., & Robaire, B. (2015). The Epididymis. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. Volume 1* (Vol. 1, pp. 691–771). <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50027-0>

Hinton, B. T., & Palladino, M. A. (1995). Epididymal epithelium: Its contribution to the formation of a luminal fluid microenvironment. *Microscopy Research and Technique*, 30(1), 67–81. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070300106>

Hua, L., Liu, Y., Zhen, S., Wan, D., Cao, J., & Gao, X. (2014). Expression and biochemical characterization of recombinant human epididymis protein 4. *Protein Expression and Purification*, 102, 52–62. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2014.08.004>

- Jalkanen, J., Kotimäki, M., Huhtaniemi, I., & Poutanen, M. (2006). Novel epididymal protease inhibitors with Kazal or WAP family domain. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *349*(1), 245–254. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.08.023>
- Jelinsky, S. A., Brown, E. L., Wilson, E., Bang, H. J., Turner, T. T., Johnston, D. S., et al. (2007). The Rat Epididymal Transcriptome: Comparison of Segmental Gene Expression in the Rat and Mouse Epididymides1. *Biology of Reproduction*, *76*(4), 561–570. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.057323>
- Johnston, D. S., Kopf, G. S., DiCandeloro, P., Wilson, E., Jelinsky, S. A., Bang, H. J., & Turner, T. T. (2005). The Mouse Epididymal Transcriptome: Transcriptional Profiling of Segmental Gene Expression in the Epididymis1. *Biology of Reproduction*, *73*(3), 404–413. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.039719>
- Kawai, T., & Akira, S. (2005). Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Host-Pathogen Interactions / Immunological Techniques*, *17*(4), 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2005.02.007>
- Kawai, T., & Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, *11*, 373.
- Krowarsch, D., Cierpicki, T., Jelen, F., & Otlewski, J. (2003). Canonical protein inhibitors of serine proteases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, *60*(11), 2427–2444. <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3120-x>
- Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2009). Toll-like receptors and innate immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *388*(4), 621–625. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.062>
- Lang, T., Hudemann, C., Tchatalbachev, S., Stammer, A., Michel, V., Aslani, F., et al. (2014). Uropathogenic Escherichia coli modulates innate immunity to suppress Th1-mediated inflammatory responses during infectious epididymitis. *Infection and Immunity*, *82*(3), 1104–1111. <https://doi.org/10.1128/IAI.01373-13>
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, *42*(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
- Lundwall, Å., & Clauss, A. (2011). Genes encoding WFDC- and Kunitz-type protease inhibitor domains: are they related? *Biochemical Society Transactions*, *39*(5), 1398. <https://doi.org/10.1042/BST0391398>
- Maeshima, N., & Fernandez, R. C. (2013). Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *3*, 3–3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00003>
- Majchrzak-Gorecka, M., Majewski, P., Grygier, B., Murzyn, K., & Cichy, J. (2016). Secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI), a multifunctional protein in the host defense response. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *28*, 79–93. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.12.001>
- McConaghy, J. R., & Panchal, B. (2016). Epididymitis: An Overview. *American Family Physician*, *94*(9), 723–726.
- McCrudden, M. T. C., Dafforn, T. R., Houston, D. F., Turkington, P. T., & Timson, D. J. (2008). Functional domains of the human epididymal protease inhibitor, eppin. *The FEBS Journal*, *275*(8), 1742–1750. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06333.x>
- Michel, V., Pilatz, A., Hedger, M. P., & Meinhardt, A. (2015). Epididymitis: revelations at the convergence of clinical and basic sciences. *Asian Journal of Andrology*, *17*(5), 756–763. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.155770>

- Michel, V., Duan, Y., Stoschek, E., Bhushan, S., Middendorff, R., Young, J. M., et al. (2016). Uropathogenic *Escherichia coli* causes fibrotic remodelling of the epididymis. *The Journal of Pathology*, *240*(1), 15–24. <https://doi.org/10.1002/path.4748>
- Mital, P., Hinton, B. T., & Dufour, J. M. (2011). The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biology of Reproduction*, *84*(5), 851–858. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087452>
- Mortimer, S. T. (2000). CASA—Practical Aspects. *Journal of Andrology*, *21*(4), 515–524. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2000.tb02116.x>
- Nicholson, A., Rait, G., Murray-Thomas, T., Hughes, G., Mercer, C. H., & Cassell, J. (2010). Management of epididymo-orchitis in primary care: results from a large UK primary care database. *The British Journal of General Practice: The Journal of the Royal College of General Practitioners*, *60*(579), e407–e422. <https://doi.org/10.3399/bjgp10X532413>
- Nickel, J. C., Siemens, D. R., Nickel, K. R., & Downey, J. (2002). The Patient With Chronic Epididymitis: Characterization Of An Enigmatic Syndrome. *The Journal of Urology*, *167*(4), 1701–1704. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)65181-6](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)65181-6)
- Nickel, J. C., Teichman, J. M. H., Gregoire, M., Clark, J., & Downey, J. (2005). Prevalence, diagnosis, characterization, and treatment of prostatitis, interstitial cystitis, and epididymitis in outpatient urological practice: The Canadian PIE Study. *Urology*, *66*(5), 935–940. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2005.05.007>
- Nukiwa, T., Suzuki, T., Fukuhara, T., & Kikuchi, T. (2008). Secretory leukocyte peptidase inhibitor and lung cancer. *Cancer Science*, *99*(5), 849–855. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2008.00772.x>
- O'Hara, L., Welsh, M., Saunders, P. T. K., & Smith, L. B. (2011). Androgen Receptor Expression in the Caput Epididymal Epithelium Is Essential for Development of the Initial Segment and Epididymal Spermatozoa Transit. *Endocrinology*, *152*(2), 718–729. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0928>
- O'Rand, M. G., Widgren, E. E., Hamil, K. G., Silva, E. J., & Richardson, R. T. (2011). Epididymal Protein Targets: A Brief History of the Development of Epididymal Protease Inhibitor as a Contraceptive. *Journal of Andrology*, *32*(6), 698–704. <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012781>
- O'Rand, M. G., Silva, E. J. R., & Hamil, K. G. (2016). Non-hormonal male contraception: A review and development of an Eppin based contraceptive. *Pharmacology & Therapeutics*, *157*, 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.11.004>
- Palladino, M.A., Johnson, T. A., Gupta, R., Chapman, J. L., & Ojha, P. (2007). Members of the Toll-Like Receptor Family of Innate Immunity Pattern-Recognition Receptors Are Abundant in the Male Rat Reproductive Tract1. *Biology of Reproduction*, *76*(6), 958–964. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059410>
- Palladino, Michael A., Savarese, M. A., Chapman, J. L., Dughi, M.-K., & Plaska, D. (2008). ORIGINAL ARTICLE: Localization of Toll-Like Receptors on Epididymal Epithelial Cells and Spermatozoa. *American Journal of Reproductive Immunology*, *60*(6), 541–555. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2008.00654.x>
- Park, B. S., Song, D. H., Kim, H. M., Choi, B.-S., Lee, H., & Lee, J.-O. (2009). The structural basis of lipopolysaccharide recognition by the TLR4–MD-2 complex. *Nature*, *458*, 1191.
- Patrão, M. T. C. C., Silva, E. J. R., & Avellar, M. C. W. (2009). Androgens and the male reproductive tract: an overview of classical roles and current perspectives. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, *53*, 934–945.

- Pilatz, A., Hossain, H., Kaiser, R., Mankertz, A., Schüttler, C. G., Domann, E., et al. (2015). Acute Epididymitis Revisited: Impact of Molecular Diagnostics on Etiology and Contemporary Guideline Recommendations. *European Urology*, 68(3), 428–435. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.12.005>
- Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.-Y., Huffel, C. V., Du, X., et al. (1998). Defective LPS Signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr Mice: Mutations in *Tlr4* Gene. *Science*, 282(5396), 2085. <https://doi.org/10.1126/science.282.5396.2085>
- Quintar, A. A., Roth, F. D., Paul, A. L. D., Aoki, A., & Maldonado, C. A. (2006). Toll-Like Receptor 4 in Rat Prostate: Modulation by Testosterone and Acute Bacterial Infection in Epithelial and Stromal Cells. *Biology of Reproduction*, 75(5), 664–672. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053967>
- Raetz, C. R. H., & Whitfield, C. (2002). Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annual Review of Biochemistry*, 71(1), 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
- Rajesh, A., Madhubabu, G., & Yenugu, S. (2011). Identification and characterization of Wfdc gene expression in the male reproductive tract of the rat. *Molecular Reproduction and Development*, 78(9), 633–641. <https://doi.org/10.1002/mrd.21361>
- Ribeiro, C., Romano, R., & Avellar, M. C. (2012). Beta-defensins in the epididymis: clues to multifunctional roles. *Animal Reproduction*, 9, 9.
- Ribeiro, C. M., Silva, E. J. R., Hinton, B. T., & Avellar, M. C. W. (2016). β -defensins and the epididymis: contrasting influences of prenatal, postnatal, and adult scenarios. *Asian Journal of Andrology*, 18(2), 323–328. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.168791>
- Richardson, R. T., Sivashanmugam, P., Hall, S. H., Hamil, K. G., Moore, P. A., Ruben, S. M., et al. (2001). Cloning and sequencing of human Eppin: A novel family of protease inhibitors expressed in the epididymis and testis. *Gene*, 270(1), 93–102. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(01\)00462-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(01)00462-0)
- RICKER, D. D. (1998). The Autonomic Innervation of the Epididymis: Its Effects on Epididymal Function and Fertility. *Journal of Andrology*, 19(1), 1–4. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1998.tb02463.x>
- Robaire, B., & Viger, R. S. (1995). Regulation of Epididymal Epithelial Cell Functions. *Biology of Reproduction*, 52(2), 226–236. <https://doi.org/10.1095/biolreprod52.2.226>
- Rodrigues, A., Queiróz, D. B. C., Silva, E. J. R., Honda, L., Avellar, M. C. W., & Hall, S. H. (2008). Activation of Toll-Like Receptor 4 (TLR4) by In Vivo and In Vitro Exposure of Rat Epididymis to Lipopolysaccharide from *Escherichia Coli*. *Biology of Reproduction*, 79(6), 1135–1147. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069930>
- Rusz, A., Pilatz, A., Wagenlehner, F., Linn, T., Diemer, Th., Schuppe, H. C., et al. (2012). Influence of urogenital infections and inflammation on semen quality and male fertility. *World Journal of Urology*, 30(1), 23–30. <https://doi.org/10.1007/s00345-011-0726-8>
- Sallenave, J.-M. (2002). Antimicrobial activity of antiproteinases. *Biochemical Society Transactions*, 30(2), 111. <https://doi.org/10.1042/bst0300111>
- Schagdarsurengin, U., Western, P., Steger, K., & Meinhardt, A. (2016). Developmental origins of male subfertility: role of infection, inflammation, and environmental factors. *Seminars in Immunopathology*, 38(6), 765–781. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0576-y>
- Silva, E. J. R., Patrão, M. T. C. C., Tsuruta, J. K., O’Rand, M. G., & Avellar, M. C. W. (2012). Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is differentially expressed in the male rat reproductive tract and immunolocalized in maturing spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 79(12), 832–842. <https://doi.org/10.1002/mrd.22119>

- Silva, E. J. R., Ribeiro, C. M., Mirim, A. F. M., Silva, A. A. S., Romano, R. M., Hallak, J., & Avellar, M. C. W. (2018). Lipopolysaccharide and lipotheicoic acid differentially modulate epididymal cytokine and chemokine profiles and sperm parameters in experimental acute epididymitis. *Scientific Reports*, *8*(1), 103. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17944-4>
- Sipilä, P., & Björkgren, I. (2016). Segment-specific regulation of epididymal gene expression. *Reproduction*, *152*(3). Retrieved from <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/152/3/R91.xml>
- Sipilä, P., Krutskikh, A., Pujianto, D. A., Poutanen, M., & Huhtaniemi, I. (2011). Regional Expression of Androgen Receptor Coregulators and Androgen Action in the Mouse Epididymis. *Journal of Andrology*, *32*(6), 711–717. <https://doi.org/10.2164/jandrol.110.012914>
- Sivashanmugam, P., Hall, S. H., Hamil, K. G., French, F. S., O’Rand, M. G., & Richardson, R. T. (2003). Characterization of mouse Eppin and a gene cluster of similar protease inhibitors on mouse chromosome 2. *Gene*, *312*, 125–134. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(03\)00608-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(03)00608-5)
- Small Donna M., Doherty Declan F., Dougan Caoifa M., Weldon Sinéad, & Taggart Clifford C. (2016). The role of whey acidic protein four-disulfide-core proteins in respiratory health and disease. *Biological Chemistry*, *398*(4), 425. <https://doi.org/10.1515/hsz-2016-0262>
- Stammler, A., Hau, T., Bhushan, S., Meinhardt, A., Jonigk, D., Lippmann, T., et al. (2015). Epididymitis: ascending infection restricted by segmental boundaries. *Human Reproduction*, *30*(7), 1557–1565. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev112>
- Suarez, S. S. (2008). Control of hyperactivation in sperm. *Human Reproduction Update*, *14*(6), 647–657. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn029>
- Sullivan, R., & Mieusset, R. (2016). The human epididymis: its function in sperm maturation. *Human Reproduction Update*, *22*(5), 574–587. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmw015>
- Tanaka Kazushi*, Fujisawa Masato, Arakawa Soichi, & Kamidono Sadao. (1995). Local Expression of Cytokine Messenger RNA in Rat Model of Escherichia Coli Epididymitis. *Journal of Urology*, *154*(6), 2179–2184. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)66724-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)66724-7)
- Taylor, S. N. (2015). Epididymitis. *Clinical Infectious Diseases*, *61*(suppl_8), S770–S773. <https://doi.org/10.1093/cid/civ812>
- Tracy, C. R., Steers, W. D., & Costabile, R. (2008). Diagnosis and Management of Epididymitis. *New Developments in Infection and Inflammation in Urology*, *35*(1), 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2007.09.013>
- Turner, R. M. (2005). Moving to the beat: a review of mammalian sperm motility regulation. *Reproduction, Fertility and Development*, *18*(2), 25–38.
- Turner, T. T. (2008). De Graaf’s Thread: The Human Epididymis. *Journal of Andrology*, *29*(3), 237–250. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.004119>
- Turner, T. T., Mammen, T., Kavoussi, P., Lysiak, J. J., & Costabile, R. A. (2011). Cytokine Responses to E. coli-induced Epididymitis in the Rat: Blockade by Vasectomy. *Urology*, *77*(6), 1507.e9-1507.e14. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.02.037>
- V Elfgen, A Mietens, M Mewe, T Hau, & R Middendorff. (2018). Contractility of the epididymal duct: function, regulation and potential drug effects. *Reproduction*, *156*(4), R125–R141. <https://doi.org/10.1530/REP-17-0754>
- Verrier, T., Solhonne, B., Sallenave, J.-M., & Garcia-Verdugo, I. (2012). The WAP protein Trappin-2/Elafin: A handyman in the regulation of inflammatory and immune responses. *The*

International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 44(8), 1377–1380. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2012.05.007>

Verstegen, J., Iguer-Ouada, M., & Onclin, K. (2002). Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. *Theriogenology*, 57(1), 149–179. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00664-1](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00664-1)

Wu, H., Cheng, L., Shi, L., Chen, Q., Wang, Q., Zhu, W., et al. (2016). Toll-like Receptors 4 and 5 Cooperatively Initiate the Innate Immune Responses to Uropathogenic *Escherichia coli* Infection in Mouse Epididymal Epithelial Cells. *Biology of Reproduction*, 94(3). <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.136580>

Yenugu, S., French, F. S., Hall, S. H., O'Rand, M. G., Sivashanmugam, P., Richardson, R. T., & Wang, Z. (2004). Antimicrobial Activity of Human EPPIN, an Androgen-Regulated, Sperm-Bound Protein with a Whey Acidic Protein Motif1. *Biology of Reproduction*, 71(5), 1484–1490. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.031567>

Yuan, S., Liu, Y., Peng, H., Tang, C., Hennig, G. W., Wang, Z., et al. (2019). Motile cilia of the male reproductive system require miR-34/miR-449 for development and function to generate luminal turbulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(9), 3584–3593. <https://doi.org/10.1073/pnas.1817018116>

Zhao, Y.-T., Guo, J.-H., Wu, Z.-L., Xiong, Y., & Zhou, W.-L. (2008). Innate immune responses of epididymal epithelial cells to *Staphylococcus aureus* infection. *Immunology Letters*, 119(1), 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.05.002>

Zhu, W., Zhao, S., Liu, Z., Cheng, L., Wang, Q., Yan, K., et al. (2015). Pattern Recognition Receptor–Initiated Innate Antiviral Responses in Mouse Epididymal Epithelial Cells. *The Journal of Immunology*, 194(10), 4825. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402706>