

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado
somente a partir de 27/05/2027.



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

REGIONALIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE EPIDIDIMITE MURINA: SINALIZAÇÃO CELULAR ASSOCIADA A
RECEPTORES DO TIPO *TOLL* (TLRs) E IMPACTO NA EXPRESSÃO GÊNICA

Botucatu

2024



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

**REGIONALIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA EM MODELOS
EXPERIMENTAIS DE EPIDIDIMITE MURINA: SINALIZAÇÃO CELULAR ASSOCIADA A
RECEPTORES DO TIPO *TOLL* (TLRs) E IMPACTO NA EXPRESSÃO GÊNICA**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociências de Botucatu – Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

Candidato: Me. Alexandre Dorth de Andrade

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

Botucatu

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Andrade, Alexandre Dorth de.

Regionalização da resposta inflamatória aguda em modelos experimentais de epididimite murina : sinalização celular associada a receptores do tipo *Toll* (TLRS) e impacto na expressão gênica / Alexandre Dorth de Andrade. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: Erick José Ramo da Silva
Capes: 21000000

1. Epidídimo. 2. Epididimite. 3. Fatores de transcrição.
4. Receptores *Toll*-like. 5. Resposta imune.

Palavras-chave: Epidídimo; Epididimite; Fator de transcrição; Receptores *Toll*-like; Resposta imunológica.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE ALEXANDRE DORTH DE ANDRADE, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 27 dias do mês de maio do ano de 2024, às 08:30 horas, no(a) Sala de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de ALEXANDRE DORTH DE ANDRADE, intitulada **REGIONALIZAÇÃO DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA AGUDA EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE EPIDIDIMITE MURINA: SINALIZAÇÃO CELULAR ASSOCIADA A RECEPTORES DO TIPO TOLL (TLRs) E IMPACTO NA EXPRESSÃO GÊNICA**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. ERICK JOSÉ RAMO DA SILVA (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Biofísica e Farmacologia / Instituto de Biociências de Botucatu Unesp, Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO SFORCIN (Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências, UNESP, Câmpus de Botucatu, Prof. Dr. RICARDO DE SOUZA CAVALCANTE (Participação Presencial) do(a) Departamento de Infectologia / Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp, Prof. Dr. EDSON ANTUNES (Participação Virtual) do(a) Departamento de Medicina Translacional / FCM/UNICAMP/Campinas, Prof. Dr. JORGE HALLAK (Participação Virtual) do(a) Departamento de Cirurgia, Divisão de Clínica Urológica, HCFMUSP / Universidade de São Paulo. Após a exposição pelo doutorando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. ERICK JOSÉ RAMO DA SILVA

Auxílio Financeiro

CAPES

(Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de nível Superior - Processo:
88887.657630/2021-00)

FAPESP

(Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – Processo: 2021/04746-3,
2021/06718-7)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar força e coragem para seguir meu caminho, tendo a certeza de que Ele estará comigo onde quer que eu andar!

Agradeço a minha querida esposa Thainá Omia Bueno Pereira pelo seu amor, dedicação, sensibilidade e paciência. Obrigado pelo apoio e companheirismo em todos os momentos. Agradeço a Deus todos os dias pela oportunidade de estar ao seu lado e juntos crescermos e formarmos nossa família. Muito obrigado pelo cuidado e carinho pelas nossas cachorrinhas (Liz e Luna); elas com a inocência, carinho e amor incondicional trazem luz aos nossos dias.

Agradeço aos meus queridos pais, Diva Dorth de Andrade e Marcio Alexandre de Andrade, pela dádiva da vida, pelo carinho e amor. Obrigado por apoiarem minhas escolhas, por sempre estarem ao meu lado, fazendo o possível e impossível para que tudo fique bem. Agradeço todos os dias a Deus pela honra de tê-los como pais.

Agradeço aos meus familiares (avós, tios e primos), em especial 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 ao meu orientador Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva por sempre acreditar em mim e me incentivar a sempre alcançar o meu melhor. Obrigado por entender minhas dificuldades, obrigado pelas conversas e pela amizade. Sempre serei imensamente grato por tudo que o senhor fez por mim. Obrigado por lá atrás, em 2017, ter estendido a mão a um jovem com zero experiência, mas com muita vontade em aprender. Saiba que o senhor de fato mudou a minha história, a história da minha família. Tenho muito orgulho, por onde quer que eu vá, de falar que o senhor é meu orientador.

Agradeço a Profa. Dra. Maria Christina Werneck Avellar pela colaboração, pelos ensinamentos e amizade. Obrigado por me incentivar a sempre continuar melhorando e crescendo. Muito obrigado pela preocupação e dedicação em todos os momentos.

Agradeço ao Prof. Dr. Andreas Meinhardt, a Dra. Christiane Pleuger pela oportunidade que deram de realizar um estágio extremamente produtivo em seu laboratório no Instituto de Anatomia e Biologia Celular da Justus-Liebig-Universität em Giessen, Alemanha. Agradeço por ter sido bem recebido no laboratório e meus dias foram mais leves porque estive com ótimas pessoas.

Agradeço a todos meus colegas de laboratório que estiveram presentes ao longo dessa jornada. Em especial agradeço a Noemia A. P. Mariani, Natália C. M. Santos, Isabela A. Camargo, Poliana V. Martini, pelas discussões científicas, ajuda nos experimentos e companheirismo diário.

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

Agradeço aos funcionários do Departamento de Biofísica e Farmacologia, Ana Cristina Murcia de Souza, Paulo Cesar Mioni, Luís A. de Oliveira e em especial ao 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 Biofísica e Farmacologia.

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

Agradeço as agências de fomento Capes pelo apoio da bolsa de estudo e a Fapesp pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento desse e de outros projetos do laboratório.

“Mostra-me, *Senhor*, os teus caminhos
ensina-me as tuas verdades;
guia-me com a tua verdade e ensina-me
pois tu és Deus, meu Salvador,
e a minha esperança está em ti o tempo todo.
Lembra-te, *Senhor*,
da tua compaixão e da tua misericórdia,
que tens mostrado desde a antiguidade.”

Bíblia Sagrada (Salmos 25: 4-6)

Resumo

Resumo

A epididimite, inflamação do epidídimo, é uma das doenças mais prevalentes do trato urogenital masculino, sendo um fator relevante de infertilidade masculina. Bactérias, como *E. coli* e *S. aureus*, que invadem o epidídimo via ascensão uretral retrógrada, constituem os principais agentes etiológicos da epididimite. Estudos demonstraram que estímulos inflamatórios e infecciosos produzem respostas diferentes entre as regiões do epidídimo (segmento inicial/cabeça, corpo e cauda), indicando a existência de microambientes inflamatórios e imunológicos distintos ao longo do órgão. O disparo da resposta epididimária contra infecções ocorre pela ativação de PRRs (*pattern recognition receptors*), expressos ao longo do órgão, através de PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*). Dentre os PRRs, destacamos os receptores do tipo *Toll*, tal como o TLR4 e TLR2/TLR6, que reconhecem o lipopolissacarídeo (LPS) e o ácido lipoteicoico (LTA), componentes da parede celular de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente. Com o intuito de avançar no entendimento sobre o perfil da resposta regionalizada frente à inflamação aguda do epidídimo, testamos a hipótese de que este órgão modula a sinalização celular associada ao TLR4 e TLR2/TLR6, de acordo com a região do órgão e tipo estímulo inflamatório. Portanto, investigamos a expressão e regulação de genes chaves associados à via de sinalização TLR4 e TLR2/TLR6 em modelos murinos (*in vivo* e *ex vivo*) de epididimite induzida por UPEC (*Escherichia coli* uropatogênica), LPS e LTA, seguido de ensaios de ensaios moleculares (RT-qPCR e Western blot) e de estresse oxidativo (Griess e TBARS). Nossos resultados mostram que os genes associados à sinalização TLR (*Tlr2*, *Tlr4*, *Tlr6*, *Cd14*, *Ticam1* e *Traf6*) foram positivamente regulados na cauda do epidídimo, mas não no segmento inicial, após a epididimite induzida por UPEC. Além disso, a ativação seletiva do TLR4, pelo LPS, e do TLR2/TLR6, pelo LTA levou à modulação diferencial da expressão dos transcritos *Tlr2*, *Tlr4*, *Tlr6*, *Cd14*, *Myd88*, *Ticam1*, *Traf3* e *Traf6* no segmento inicial e cauda do epidídimo. A inibição farmacológica dos fatores de transcrição AP1 e de NFκB preveniu diferencialmente as alterações induzidas por LPS e LTA no segmento inicial e na cauda do epidídimo, respectivamente. Além disso, demonstramos o rápido padrão de resposta do epidídimo com o início do aumento da produção de citocinas após a ativação dos fatores de transcrição. Adicionalmente demonstramos o perfil basal de enzimas com atividade antioxidantes nas regiões do epidídimo e apesar da regulação positiva do transcrito *Nos2* frente ao desafio inflamatório com LPS os níveis de Nox e MDA não foram alterados. Em conjunto, nossos resultados sustentam a hipótese de que o epidídimo produz um ambiente inflamatório dinâmico de acordo com a região estimulada, além de fornecer evidências de que a regulação diferencial da via TLR para diferentes estímulos infecciosos e inflamatórios contribui para as repercussões da epididimite da região proximal e distal do órgão. A marcante regulação da sinalização TLR e seus alvos a jusante NFκB e AP1 durante a inflamação do epidídimo, pode abrir caminho para novos alvos farmacológicos para terapias adjuvantes da epididimite, com o objetivo de preservar a função tecidual e a fertilidade masculina.

Abstract

Abstract

Acute bacterial infection of the epididymis, epididymitis, is a common cause of scrotal pain in men of all ages. Epididymitis is a frequent immunological cause of male subfertility or infertility in men. Ascending canicular infections with urogenital pathogens, such as *E. coli* and *S. aureus*, are the most common cause of epididymitis. Bacterial infections trigger immune responses through multiple mechanisms, including virulence factors and PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*)-mediated PRRs (*pattern recognition receptors*) activation. Among the PRRs, we highlight TLR4 and TLR2/TLR6. LPS (lipopolysaccharide) is a major PAMP of gram-negative bacteria and is recognized by TLR4, while LTA (lipoteichoic acid) is the major PAMPs of gram-positive bacteria recognized by TLR2/TLR6. In this study, we tested the hypothesis that the epididymis modulates the TLR-associated signaling pathways dependent manner of the epididymis-region and type inflammatory stimulus. For that, we evaluated the expression and regulation of key genes associated with the TLR4 and TLR2/TLR6 signaling in mice epididymitis models (*in vivo* and *ex vivo*), induced by UPEC, LPS, and LTA, followed by molecular (RT-qPCR and Western blot), and oxidative stress (Griess and TBARS) assays. Our results show that the UPEC infection up-regulated TLR-associated signaling pathways genes (Tlr2, Tlr4, Tlr6, Cd14, Ticam1, and Traf6) in the cauda epididymidis but not in the initial segment. Furthermore, selective activation of TLR4 by LPS and TLR2/TLR6 by LTA led to differential modulation of the transcript levels that Tlr2, Tlr4, Tlr6, Cd14, Myd88, Ticam1, Traf3, and Traf6 in the initial segment and cauda epididymidis. Pharmacological inhibition of transcription factors AP1 and NFκB prevented LPS- and LTA-induced changes in the initial segment and cauda epididymidis, respectively. In addition, we show a fast response of the epididymis to the LPS challenge, increasing cytokine expression profile following transcription factors activation. The epididymis presents basal expression levels of enzymes with antioxidant activity and despite LPS-induced up-regulation *Nos2* transcript, the levels of Nox and MDA were not changed. Our results support the hypothesis that the epididymis produces a dynamic inflammatory environment depending on the region stimulated, highlighting differential regulation of the TLR-associated pathway to infectious and inflammatory stimuli contributes to the outcomes in the proximal and distal epididymis. Given the tight regulation of TLR signaling and their downstream targets NFκB and AP1 during epididymal inflammation, they emerge as potential targets for adjuvant epididymitis therapies intending to preserve tissue function and male fertility.

Listas

Lista de Siglas

ACT: *actin* (*actina*)

AP1: *activator protein 1* (proteína ativadora 1)

AR: *androgen receptor* (receptor de androgênios)

CAT: *catalase*

CD14: *cluster differentiation 14* (cluster de diferenciação 14)

CFTR: *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* (regulador da condutância transmembrana na fibrose cística)

CGN: *cingulin* (cingulina)

CLDNs: *claudins* (claudinas)

CTD: *C-terminal domain* (domínio C-terminal)

CTNNA: *catenin alpha* (catenina alfa)

CTNNB1: *catenin beta 1* (catenina beta 1)

DAMPs: *danger-associated molecular patterns* (padrões moleculares associados a danos)

DCs: *dendritic cells* (células dendríticas)

DHT: *dihydrotestosterone* (di-hidrotestosterona)

ERK: *signal-regulated kinase* (quinases reguladas por sinais extracelulares)

FHCE1: *fertile human caput epididymal cell line 1*

GPX: *glutathione peroxidase* (glutathiona peroxidase)

GST: *glutathione-S-transferases* (glutathiona-S-transferases)

IFN: *interferon*

IKK: *IκB kinase* (IκB quinase)

IKKi: *IKK epsilon* (IKK épsilon)

IL: *interleukin* (interleucina)

IL-R: *IL-1 receptor* (receptor de interleucina-1)

IRAK: *interleukin 1 receptor associated kinase* (quinase associada ao receptor de interleucina 1)

IRF3: *interferon-regulatory factor 3* (fator regulador de interferon 3)

JNK: *c-Jun N-terminal kinase* (c-Jun N-terminal quinase)

KDO: *3-deoxy-D-manno-oct-2-ulose-5-phosphate* (ácido 3-deóxi-D-mano-oct-2-ulossônico)

LBP: *LPS-binding protein* (proteína de ligação ao LPS)

LPS: *lipopolysaccharide* (lipopolissacarídeo)

LRRs: *leucine-rich repeat* (repetições ricas em leucina)

LTA: *lipoteichoic acid* (ácido lipoteicoico)

MAL: *myelin and lymphocyte protein* (proteína de mielina e linfócitos)

MAPKs: *mitogen-activated protein kinases* (proteínas quinases ativadas por mitógeno)

MD2: *myeloid differentiation factor 2* (fator de diferenciação mielóide 2)

MPs: *mononuclear phagocytes* (fagócitos mononucleares)

MT: *metallothioneins* (metalotioneínas)

MYD88: *myeloid differentiation primary response gene 88* (gene de resposta primária a diferenciação mielóide 88)

NFkB: *nuclear factor kappa B* (fator nuclear kappa B)

NHE3: *Na⁺/H⁺ exchanger type 3*

NK: *natural killer*

NLRs: *NOD-like receptors* (receptores do tipo NOD)

NOS2: *nitric oxide synthase 2* (óxido nítrico sintase 2)

NTD: *N-terminal domain* (domínio N-terminal)

PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns* (padrões moleculares associados a patógenos)

PCBs: *polychlorinated biphenyls* (bifenilas policloradas)

PDTC: ammonium pyrrolidine dithiocarbamate

PRDX: *peroxiredoxin* (peroxirredoxinas)

PRRs: *pattern recognition receptors* (receptores de reconhecimento de padrões)

PTGS1: *prostaglandin-endoperoxide synthase 1* (prostaglandina endoperóxido sintase 1)

RNS: *reactive nitrogen species* (espécies reativas de nitrogênio)

ROS: *reactive oxygen species* (espécies reativas de oxigênio)

SOD1: *superoxide dismutase 1* (superóxido dismutase 1)

TAMP: *tight junction-associated MARVEL proteins* (proteínas MARVEL associadas a junções estreitas)

TANK: *TRAF family-member-associated NFkB activator*

TBK1: *TANK binding kinase 1*

TGFB: *transforming growth factor beta* (fator de crescimento transformador beta)

TICAM1: *TIR domain containing adaptor molecule 1* (molécula adaptadora contendo domínio TIR)

TIR: *Toll-IL-1 receptor* (receptor Toll-IL-1)

TIRAP: *TIR domain containing adaptor protein* (proteína adaptadora contendo o domínio TIR)

TLO: *tertiary lymphoid organs* (órgãos linfoides terciários)

TLRs: *Toll-like receptors* (receptores do tipo Toll)

TRAF: *TNF-receptor associated factor* (fator associado ao receptor de TNF)

TRAM: *TRIF-related adaptor molecule* (molécula adaptadora relacionada ao TRIF)

UPEC: *uropathogenic Escherichia coli* (*Escherichia coli* uropatogênica)

V-ATPase: *vacuolar-type H⁺-ATPase*

WFDC: *Whey-acidic protein four disulfide core*

ZO: *zona occludens* (zona ocludente)

Lista de Figuras

CAPÍTULO 1: Introdução

Figure 1. Desenvolvimento morfofogenéticos do ducto mesonéfrico murino	23
Figura 2. Morfologia do epidídimo de camundongo	27
Figura 3. Marcação por imunofluorescência das células principais, estreitas, claras e basais do epitélio epididimário	28
Figura 4. Representação esquemática das junções estreitas	32
Figure 5. Visão geral esquemática das regiões do epidídimo de camundongo	33
Figure 6. Localização dos fagócitos mononucleares na região proximal e distal do epidídimo	35
Figure 7. Representação comparativa entre a estrutura do receptor TLR e IL-R	38
Figure 8. Estrutura geral dos complexos TLR4-LPS e TLR2/6-LTA	42
Figure 9. Representação esquemática das vias de sinalização TLR4 e TLR2/TLR6.	45
Figura 10. Espectro de patógenos em pacientes com epididimite aguda	47

CAPÍTULO 2: Regional TLR signaling during acute epididymitis

Figure 1. Effects of UPEC-induced epididymitis on the relative levels of TLR-associated pathway transcripts in the epididymis	86
Figure 2. Effects of interstitial and intravascular LPS- and LTA-induced epididymitis on the relative levels of TLR-associated pathway transcripts in the epididymis	89
Figure 3. Time-dependent effects of LPS and LTA treatment in the initial segment and cauda epididymidis on RELA and cJUN phosphorylation	91
Figure 4. Effects of pharmacological inhibition of NF κ B activation on interstitial and intravascular LPS- and LTA-induced changes on the expression levels of TLR-associated pathway genes in the epididymis	93
Figure 5. Effects of pharmacological inhibition of cJUN/AP1 activation on interstitial and intravascular LPS- and LTA-induced changes on the expression levels of TLR-associated pathway genes in the epididymis	95
Supplementary Figure S1. Scheme of TLR4 and TLR2/TLR6 signaling pathways following activation by LPS and LTA, respectively	108
Supplementary Figure S2. Validation of the antibodies (anti-RELA, anti-p-RELA, anti-cJUN, and anti-p-cJUN) used in the Western blot experiments	109
Supplementary Figure S3. Histological images of the epididymis of uropathogenic <i>Escherichia coli</i> (UPEC)-infected C57BL/6J mice at 1, 5, and 10 days post-infection	110

Supplementary Figure S4. Full-length images of the Western blot experiments showed in Figure 3, panel A	111
Supplementary Figure S5. Full-length images of the Western blot experiments showed in Figure 3, panel B	112
Supplementary Figure S6. Western blot experiments and densitometry analyses conducted for the detection of RELA, p-RELA(Ser536), cJUN, p-cJUN (Ser73), and B-actin in the total protein extracts from the initial segment and cauda epididymidis challenged with LPS and LTA	113
Supplementary Figure S7. Effects of LPS and LTA on <i>ex vivo</i> organ culture system of epididymis on mRNA levels of the pro-inflammatory gene interleukin-6 (<i>Il6</i>) and tumor necrosis factor- α (<i>Tnf</i>) in the initial segment and cauda epididymidis	114
Supplementary Figure S8. Effects of LPS and LTA on <i>ex vivo</i> organ culture system of epididymis on the relative levels of TLR-associated pathway transcripts in the initial segment and cauda epididymidis	115
Supplementary Figure S9. Effects of pharmacological inhibition of NF κ B and c-JUN/AP-1 activation on interstitial and intravascular LPS-induced changes on the expression of pro-inflammatory gene markers <i>Il6</i> and <i>Tnf</i> in the epididymis	116

CAPÍTULO 3: Citocinas e estresse oxidativo em modelos experimentais de epididimite *in vivo* e *ex vivo* induzida por LPS

Figura 1. Efeitos da epididimite <i>ex vivo</i> induzida por LPS no perfil de expressão de citocinas e quimiocinas no segmento inicial e cauda do epidídimo de camundongos	128
Figura 2. Perfil de expressão de elementos antioxidantes no epidídimo	129
Figura 3. Perfil oxidativo no segmento inicial e na cauda do epidídimo	130

Anexo

Anexo 1. Certificado CEUA nº 6272050320	141
Anexo 2. Fluxo de construção dos dados apresentados na Tese conforme os modelos experimentais	142
Anexo 3. Original Article - Andrade et al 2024 - DOI: 10.1111/andr.13630	143
Anexo 4. Declaração estágio Justus-Liebig-Universität Giessen	144

Lista de tabelas

CAPÍTULO 1: Introdução

Tabela 1. Resumo da expressão dos TLRs no epidídimo de camundongos 39

Tabela 2. Modelos murinos de indução de epididimite 48

CAPÍTULO 2: Regional TLR signaling during acute epididymitis

Supplementary Table S1. Oligonucleotides primers used in the RT-qPCR assays. 118

Supplementary Table S2. Impact of *ex vivo* and *in vivo* LPS or LTA exposure on the initial segment and cauda epididymidis 119

CAPÍTULO 3: Citocinas e estresse oxidativo em modelos experimentais de epididimite

in vivo e *ex vivo* induzida por LPS

Tabela suplementar 1. Efeitos da epididimite *ex vivo* entre os segmentos. Resumo dos dados apresentados na figura 1 137

Sumário

CAPÍTULO 1: Introdução

O epidídimo	22
Estrutura e função do epidídimo	25
Integridade e defesa do epidídimo	30
Imunidade inata do epidídimo: os receptores do tipo <i>Toll</i> (TLRs)	37
<i>Transdução de sinal da via TLR: ativação da via canônica (MYD88) e da via não-canônica (TICAM1)</i>	43
A epididimite	45
Modelos experimentais de epididimite	48
Referências	52

Objetivos

Objetivo geral	73
Objetivos específicos	73

CAPÍTULO 2: Regional TLR signaling during acute epididymitis

Regional modulation of toll-like receptor signaling pathway genes in acute epididymitis in mice

Introduction	77
Materials and methods	80
Animals	80
<i>In vivo uropathogenic E. coli -induced epididymitis model</i>	80
<i>In vivo lipopolysaccharide and lipoteichoic acid-induced epididymitis models</i>	81
<i>Ex vivo lipopolysaccharide and lipoteichoic acid-induced epididymitis using organ culture</i>	81
Reverse transcriptase reaction and real-time polymerase chain reaction	82
Western blot	83
Statistical analysis	84
Results	84
Uropathogenic <i>E. coli</i> up-regulated the transcript levels of toll-like receptor-associated signaling genes in the corpus and cauda but not in the initial segment and caput epididymidis	84

Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid differentially modulated the transcript levels of toll-like receptor-associated signaling genes in the initial segment and cauda epididymidis	87
<i>Ex vivo Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid exposure leads to different RELA/NFKB and cJUN/AP1 phosphorylation patterns in the initial segment and cauda epididymidis</i>	90
Pharmacological inhibition of nuclear factor kappa B prevents lipopolysaccharide and lipoteichoic acid-induced changes in the toll-like receptor-associated signaling in the cauda epididymidis but only partially in the initial segment	92
Pharmacological inhibition of cJUN/AP1 activation prevents lipopolysaccharide and lipoteichoic acid-induced changes in the toll-like receptor-associated signaling in the initial segment but not in the cauda epididymidis	94
Discussion	96
Conclusion	100
References	102
Supplementary Material	106

CAPÍTULO 3: Citocinas e estresse oxidativo em modelos experimentais de epididimite *in vivo* e *ex vivo* induzida por LPS

Introdução	121
Material e método	122
Epididimite <i>ex vivo</i> induzida por LPS	122
Epididimite <i>in vivo</i> induzida por LPS	122
Análise de Banco de dados	123
Ensaio de reação de transcriptase reversa (RT) e reação de polimerase em cadeia em tempo real (qPCR)	123
Ensaio de Luminex	124
Determinação de Nitrato/Nitrito (Nox total)	125
Determinação de peroxidação lipídica	126
Análise estatística	126
Resultado	127

Respostas inflamatórias agudas do segmento inicial e da cauda do epidídimo de camundongos ao estímulo <i>ex vivo</i> com LPS	127
--	-----

Status oxidativo no epidídimo após o estímulo inflamatório <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i> induzido com LPS	128
---	-----

Discussão	130
------------------------	------------

Referências	133
--------------------------	------------

Conclusão

Conclusão	139
------------------------	------------

ANEXO

Anexo 1	141
----------------------	------------

Anexo 2.	142
----------------------	------------

Anexo 3	143
----------------------	------------

Anexo 4	144
----------------------	------------

CAPÍTULO 1

Introdução

O epidídimo

Essencial para o sistema reprodutor masculino de mamíferos, o epidídimo é responsável pela maturação, transporte, concentração, armazenamento e proteção dos espermatozoides até a ejaculação. Esse órgão complexo exibe uma morfologia única, sendo formado por uma estrutura tubular altamente enovelada e revestida por um epitélio pseudoestratificado, apresentando de três a quatro regiões, conforme a espécie, interligadas com propriedades anatômicas e funcionais distintas (Hinton & Robaire, 2015; Lee et al., 2023; Sullivan et al., 2019). Cada região do epidídimo é subdividida em segmentos separados por tecido conectivo, os quais exibem distintos perfis de expressão que determinam a secreção de proteínas específicas do segmento no fluido luminal, estabelecendo compartimentos fisiológicos únicos que afetam diretamente a qualidade do espermatozoide (Belleannée et al., 2012, 2011; Cornwall, 2009; Cornwall et al., 1990; Dubé et al., 2007; Jelinsky et al., 2007; Johnston et al., 2005; Thimon et al., 2007).

Embriologicamente, o epidídimo é derivado do ducto mesonéfrico, também conhecido como ducto de Wolff, que por sua vez tem origem a partir da camada mesodérmica. Esta é uma das camadas germinativas primárias, que se diferencia em três segmentos distintos: o mesoderme da placa paraxial, intermediária e lateral (Lee et al., 2023). O sistema urogenital é derivado do mesoderma intermediário e, em embriões humanos no Estágio Carnegie 11, os ductos mesonéfricos passam por transições mesenquimais-epiteliais e formam dois ductos epiteliais canalizados; já em camundongos, é o resultado de uma interação complexa entre o mesoderma intermediário e paraxial (de Mello Santos & Hinton, 2019; Hinton & Robaire, 2015; Jacob et al., 2012; Takahashi et al., 2018).

Em camundongos, a formação de ducto mesonéfrico começa no dia embrionário ~8,5 e é completada ao atingir a cloaca no dia embrionário ~9,5 (Murashima et al., 2015b; Staack et al., 2003). Posteriormente, no dia embrionário ~14,5 o ducto mesonéfrico está relativamente reto, começando seu dobramento na região anterior, entre os dias embrionários ~15,5 e ~16,5 (Figura 1A) (Murashima et al., 2015b; Ribeiro et al., 2017; Welsh et al., 2009). No dia

embrionário ~17,5, o ducto progride seu enovelamento, dando origem a uma estrutura tridimensional altamente complexa, seguida pela dobradura na região posterior (cauda) no dia embrionário ~18,5 (Figura 1 A) (Hirashima, 2014; Joseph et al., 2009). As alterações morfológicas observadas durante o desenvolvimento embrionário do ducto mesonéfrico transformam um ducto reto em uma estrutura tridimensionalmente longa, enovelada e regionalizada. Alterações que perturbem os eventos pelos quais o ducto mesonéfrico passa durante a fase do desenvolvimento embrionário podem resultar em formato e comprimento anormais do epidídimo que mais tarde, na idade adulta, podem comprometer a maturação dos espermatozoides e, portanto, a fertilidade masculina (Kumar et al., 2016; Murashima et al., 2015b; Ribeiro et al., 2017).

Ao nascer, o epidídimo sofre enovelamento adicional considerável nas regiões proximais (segmento inicial ao corpo), enquanto a cauda ainda não completou o enovelamento (Figura 1 B) (Hinton & Robaire, 2015; Hinton et al., 2011). No rato, entre os dias 1 à 15 pós-natais, o epidídimo apresenta um período indiferenciado, seguindo por uma fase de diferenciação entre os dias 15 à 44 pós-natais. Nesse período os espermatozoides são observados pela primeira vez na luz do ducto, culminando em um período de expansão do dia 44 pós-natal até a idade adulta (Avellar & Hinton, 2019; Hinton & Robaire, 2015).

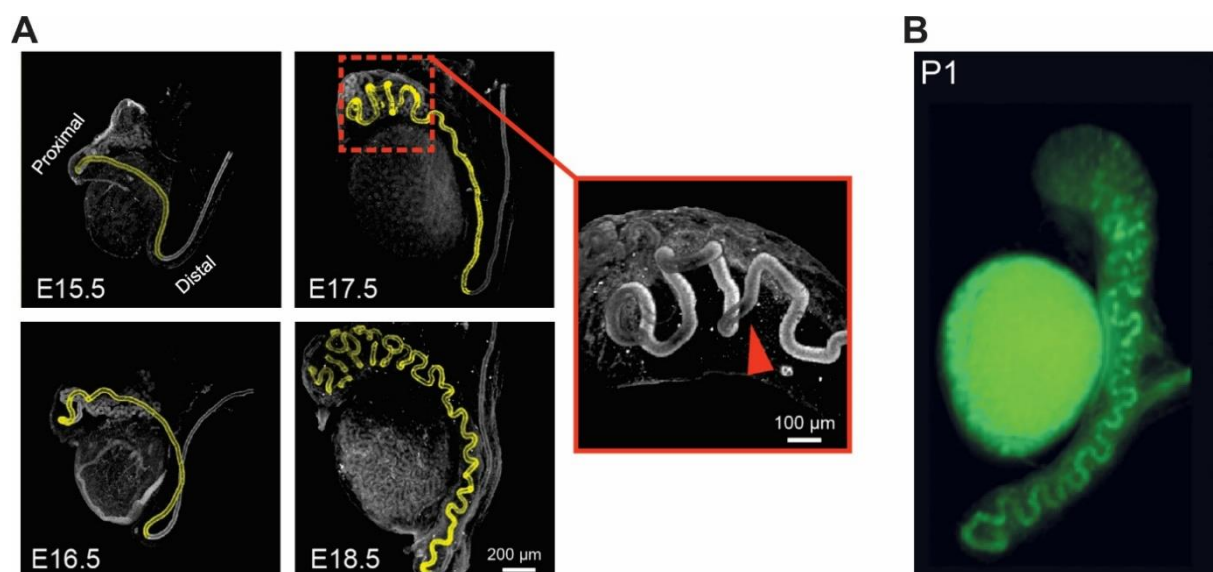


Figure 1. Desenvolvimento morfogenéticos do ducto mesonéfrico murino. (A) Processo de desenvolvimento do ducto mesonéfrico, representado em amarelo, do E ~15,5 ao dia ~18,5. Barra de escala: 200 μ m. Figura tridimensional do quadrado pontilhado laranja em E ~17,5 indicando o processo de enovelamento (ponta de seta). (B) Ducto mesonéfrico de camundongo *hoxb7-GFP* no P 1. (Imagens reproduzidas com adaptações de Hinton & Robaire, 2015; Hinton et al., 2011; Hirashima, 2014). E, dia embrionário; P, dia pós-natal.

Ainda durante a fase de embriogênese, os androgênios produzidos nos testículos são um fator importante que regulam a estabilização do ducto mesonéfrico no trato reprodutor masculino (Murashima et al., 2015b, 2011; Patrão et al., 2009; Ribeiro et al., 2017; Robaire & Hamzeh, 2011; Welsh et al., 2009). Após a diferenciação sexual gonadal, os testículos começam a produzir os androgênios aproximadamente no dia embrionário ~12,5 (DeFalco & Capel, 2009; Shima et al., 2013). A testosterona, mas não o seu metabolito DHT (*dihydrotestosterone*), desempenha papel dominante nestes processos via ativação do AR (*androgen receptor*) (Hannema et al., 2006; Imperato-McGinley et al., 1992; Murashima et al., 2015a, 2011; Ribeiro et al., 2017, 2017; Tsuji et al., 1991; Welsh et al., 2009). O AR, um membro da superfamília de receptores nucleares, tem sua expressão detectada principalmente no mesênquima que circunda o epitélio do ducto mesonéfrico no dia embrionário ~13,5 em camundongos (Murashima et al., 2015b, 2015a, 2011).

Dos estágios posteriores do desenvolvimento pós-natal até à idade adulta, a expressão de AR no epitélio do epidídimo é maior do que nas células do estroma (Avellar & Hinton, 2019; O'Hara et al., 2011; Zhou et al., 2002). No epidídimo adulto, os níveis de androgênios são mais elevados nas regiões proximais do que nas distais, um dos principais determinantes do padrão altamente regionalizado de expressão gênica ao longo deste tecido (Avellar & Hinton, 2019; Hinton & Robaire, 2015). 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). No epidídimo adulto, tanto a testosterona quanto a DHT são os estimuladores primários de suas funções.

Na ausência de androgênios, como por exemplo, em modelos experimentais em roedores de castração cirúrgica, o epidídimo sofre uma onda de apoptose, perda da capacidade de secreção de proteínas e alterações significativas na sua expressão gênica, que promovem redução do seu tamanho e peso e perda da função (Avellar & Hinton, 2019; Carvelli et al., 2021; Hinton & Robaire, 2015; Murashima et al., 2011).

Estrutura e função do epidídimo

Apesar de ser formado por um ducto único e altamente contorcido, o epidídimo apresenta alto nível de complexidade organizacional e funcional (Battistone et al., 2020; Browne et al., 2018; Domeniconi et al., 2016; Johnston et al., 2007, 2005; Leir et al., 2020; Pleuger et al., 2022; Rinaldi et al., 2020). Classicamente em roedores (ratos e camundongos), o epidídimo está organizado em 4 regiões com funções chave distintas: o segmento inicial, a cabeça, o corpo e a cauda do epidídimo. 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 A) (Breton et al., 2019; Hinton & Robaire, 2015; Jelinsky et al., 2007; Johnston et al., 2005; Mendelsohn et al., 2020; Stammier et al., 2015; Turner, 2008; Turner et al., 2003). Embora estudos apontem a presença de 5 a 10 segmentos no epidídimo humano, os septos são em sua maioria incompletos e apresentam grande variabilidade, com apenas o septo delimitando a região dos ductos eferentes podendo ser observado consistentemente. Portanto, o número exato de segmentos do epidídimo humano ainda carece de estudos mais aprofundados (Domeniconi et al., 2016; Sullivan et al., 2019).

O epitélio pseudoestratificado do epidídimo inclui células principais, estreitas, claras e basais (Figura 3). Células principais e basais estão presentes em todo o epidídimo, mas células estreitas estão localizadas exclusivamente no segmento inicial, enquanto células claras estão presentes na cabeça, corpo e cauda do epidídimo (Figura 2 B) (Belleannée et al., 2012; Cornwall, 2009; Hinton & Robaire, 2015). Além disso, células imunológicas como

macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T e células NK (*natural killer*) também estão presentes no epitélio epididimário, conforme abordado posteriormente.

Dependendo da região examinada, as células principais compreendem aproximadamente 65-80% da população total de células epiteliais do epidídimo (Figura 3A). A contribuição das células principais para o estabelecimento de um ambiente luminal no epidídimo é complexa e varia dependendo da sua localização ao longo do órgão (Breton et al., 2019; Hinton & Robaire, 2015; Rinaldi et al., 2020). Essas células são secretoras e absorvivas altamente competentes, responsáveis pela produção de grande parte da composição proteica luminal do epidídimo, bem como por desempenharem papéis adicionais na modulação do pH luminal e na sinalização lumínica (Breton et al., 2019, 2016; Rinaldi et al., 2020).

No segmento inicial, as células principais reabsorvem o bicarbonato através de transportadores, tal como NHE3 (*Na⁺/H⁺ exchanger type 3*), enquanto na cauda do epidídimo possuem a capacidade de secretar bicarbonato ou prótons, dependendo de sinais fisiológicos (Bagnis et al., 2001; Breton et al., 2016; Park et al., 2017; Shum et al., 2011). A secreção de bicarbonato pelas células principais é mediada indiretamente pelo canal de K⁺ CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) e induz uma alcalinização do ambiente luminal (Breton et al., 2016; Carlin et al., 2003; Park et al., 2017; Ruan et al., 2012; Sedlacek et al., 2001; Yefimova et al., 2019). Porém, uma elevação sustentada do pH luminal e da concentração de bicarbonato pode ser considerada prejudicial aos espermatozoides, por mantê-los num estado pré-ativado durante o armazenamento (Breton et al., 2016).

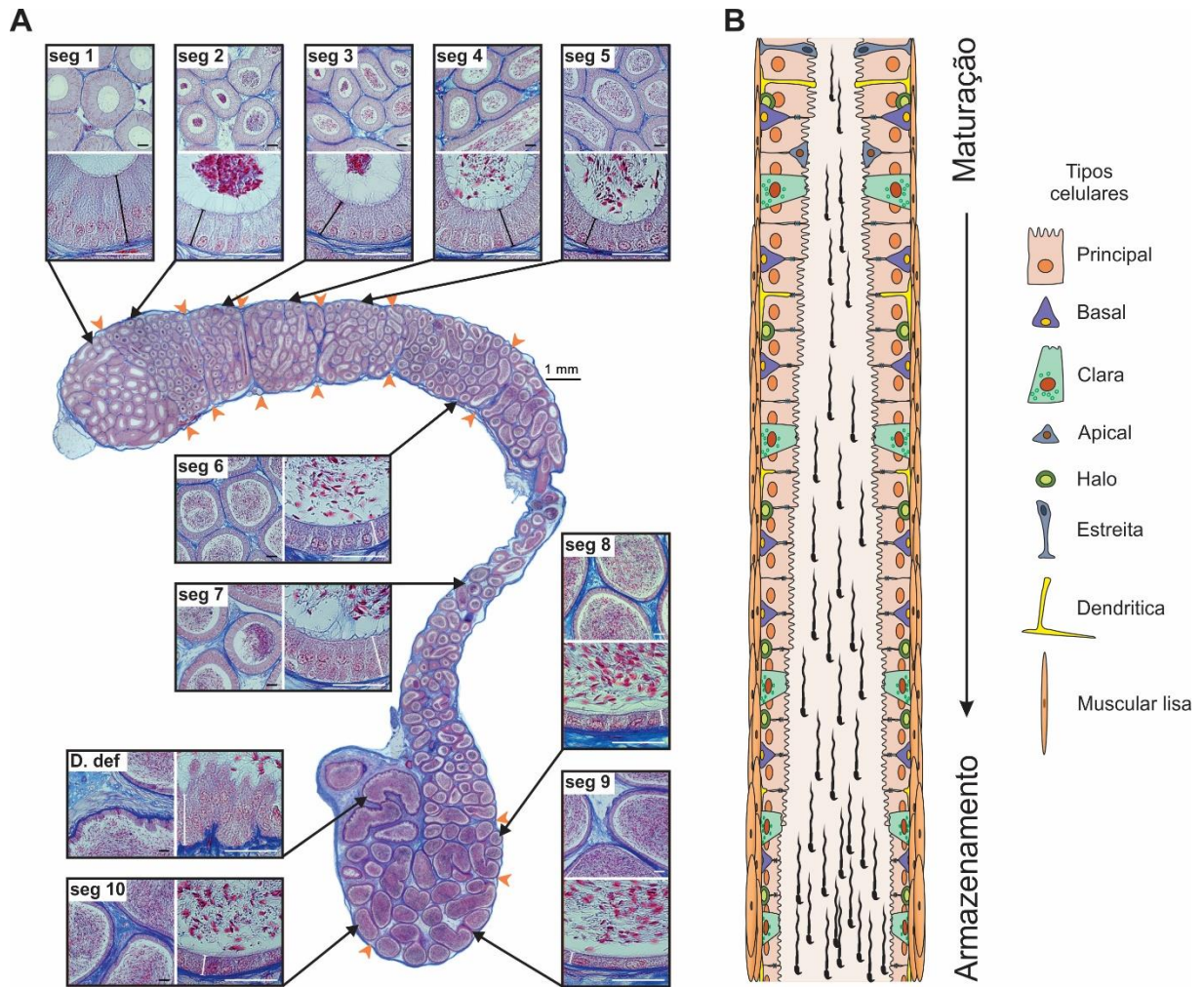


Figura 2. Morfologia do epidídimo de camundongo. (A) Secção longitudinal de um epidídimo marcado pela coloração de Azan (marcação das fibras de colágeno). As quatro regiões clássicas do epidídimo (SI, CB, CO e CD) podem ser subdivididas em segmentos separados por septos intersticiais de tecido conjuntivo, apontando a presença de 10 segmentos no epidídimo de camundongos. Os segmentos 1 e 2 representam o SI, o segmento de 3 a 5 representam a CB, os segmentos 6 e 7 representam o CO e os segmentos de 8 a 10 representam a CD. Na parte distal do segmento 10, o ducto da CD transita para o ducto deferente. Os septos que representam os limites dos segmentos são marcados pelas pontas de seta laranja. O epitélio é exibido em detalhes para cada segmento. A altura da parte citoplasmática do epitélio é indicada por barras em forma de T. (B) A morfologia e distribuição relativa das células epiteliais (células principais, células basais, células claras, células apicais, células estreitas e células imunes - células halo e células mononucleares), o diâmetro do compartimento luminal e a espessura da camada muscular lisa que circundam o epitélio variam ao longo do comprimento do epidídimo. (figuras adaptadas de Spadella et al., 2023; Thong et al., 2014). SI, segmento inicial; CB, cabeça; CO, corpo; CD, cauda; seg, segmento.

Tanto as células claras quanto as células estreitas secretam prótons ativamente na luz do ducto, por meio da bomba de prótons V-ATPase (*vacuolar-type H⁺-ATPase*), esse processo requer a hidrólise de ATP (Figura 3B,C). Para manter o suporte de ATP, as células claras e estreitas possuem um número grande de mitocôndrias em comparação as células vizinhas (Breton et al., 2016; Breton & Brown, 2013). Além de expressar genes que codificam subunidades da V-ATPase e proteínas que interagem com V-ATPase, as células claras também expressam altos níveis de genes envolvidos na produção de energia metabólica e de tráfego de membrana (Figura 3C) (Breton & Brown, 2013; Shum et al., 2014). Adicionalmente, as células claras possuem papel essencial na acidificação luminal, mantendo o espermatozoide em estado quiescente (Battistone et al., 2019; Breton et al., 2019; Breton & Brown, 2013; Rinaldi et al., 2020).

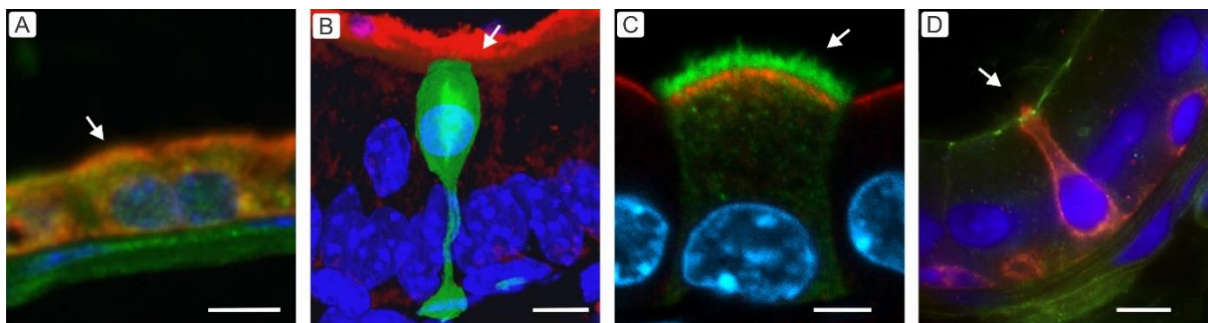


Figura 3. Marcação por imunofluorescência das células principais, estreitas, claras e basais do epitélio epididimário. (A) Ampliação de uma célula principal (a seta indica a dupla marcação para NHE3 em verde e V-ATPase em vermelho). A barra de escala representa 20 μ m (imagem de Park et al., 2017). (B) Ampliação de uma célula estreita (a seta indica a marcação para a subunidade B1 de V-ATPase em verde) no segmento inicial do epidídimo, o núcleo está localizado na região apical do epitélio, em comparação com a célula principal adjacente. A barra de escala representa 5 μ m (imagem de Breton et al., 2019). (C) Ampliação de uma célula clara (a seta indica a dupla marcação para clatrina em vermelho e V-ATPase em verde) na cauda do epidídimo em pH 7,8. A barra de escala representa 2,5 μ m (imagem de Battistone et al., 2019). (D) Ampliação de uma célula basal (a seta indica a marcação para claudina 1 em vermelho) formando uma junção estreita com as células principais adjacentes. A barra de escala representa 5 μ m (imagem de Shum et al., 2008). Os núcleos estão marcados em azul (DAPI). NHE3, Na⁺/H⁺ exchanger type 3; V-ATPase, vacuolar-type H⁺-ATPase.

Residentes em todas as regiões do epidídimo, as células basais são identificadas por seus núcleos redondos localizados na base do epitélio e abaixo das células epiteliais adjacentes (Figura 3D) (Arrighi, 2014; Hinton & Robaire, 2015; Shum et al., 2014, 2008). Originalmente, acreditava-se que essas células nunca entravam em contato com a luz do ducto, porém as células basais exibem características morfológicas específicas de cada região do epidídimo, variando de uma célula em forma de cúpula localizada abaixo das células principais, até células que estendem processos corporais longos e estreitos, chamados de axiópodes, que se projetam até a luz do ducto entre as células epiteliais adjacentes principalmente na região proximal da cauda do epidídimo no rato e no segmento inicial do epidídimo no camundongo, indicando que sua formação pode depender de estímulos locais (Figura 3D) (Breton et al., 2019; Robaire & Viger, 1995; Shum et al., 2014, 2008).

Embora o papel das células basais no epidídimo ainda não esteja claro, estudos apontam a presença de enzimas envolvidas no metabolismo dos radicais livres de oxigênio, conhecida como SOD1 (*superoxide dismutase 1*), além de membros da família de proteínas GSTs (*glutathione-S-transferases*), bem como MT (*metallothioneins*) nas células basais do epidídimo (Cyr et al., 2001; Mandon et al., 2015; Nonogaki et al., 1992; Papp et al., 1995). Acredita-se que as células basais desempenham papel importante na manutenção da integridade estrutural da barreira hemato-epididimária (Pinel et al., 2019). De fato, as células basais formam uma rede densa no lado basolateral do epitélio e são conectadas entre si por meio de junções comunicantes (Cyr, 2011; Kim et al., 2015). Adicionalmente, além do seu papel na regulação da função epitelial via *crosstalk* com outros tipos celulares, as células basais também tem a capacidade de monitorar o ambiente luminal do epidídimo (Liu et al., 2024; Shum et al., 2009, 2008).

Conforme ocorre na luz de vários outros órgãos tubulares, as células epiteliais estabelecem um ambiente luminal único, executando o transporte de íons, nutrientes, solutos e água. Este importante processo muitas vezes envolve *crosstalk* íntimo e colaboração com células vizinhas, tanto epiteliais quanto não epiteliais (Breton et al., 2019; Breton & Brown,

2013; Hinton & Robaire, 2015). No geral, o *crosstalk* entre células epiteliais no epidídimo é necessário para regular e manter o ambiente para a maturação e armazenamento dos espermatozoides (Breton et al., 2016; Jeong et al., 2020). Estudos demonstram que células do epidídimo liberam ATP na luz do ducto, apresentando considerável *crosstalk* envolvendo ATP entre as células do epidídimo e o espermatozoide em maturação (Cyr et al., 2018; Ruan et al., 2014). Portanto, essas observações destacam a necessidade do desenvolvimento de estudos que busquem compreender como diferentes cenários, tais como estímulos inflamatórios, modificam os diferentes mecanismos de comunicação célula-célula envolvidos no estabelecimento do ambiente luminal do epidídimo.

Integridade e defesa do epidídimo

As células epiteliais estão ligadas umas às outras através de junções estreitas, que são componentes da barreira hemato-epididimária e contribuem para o estabelecimento e manutenção do ambiente luminal único no qual os espermatozoides do epidídimo transitam (Breton et al., 2019; Gregory & Cyr, 2014; Kim & Breton, 2016; Mital et al., 2011). A formação das junções estreitas envolve as interações de moléculas de adesão celular entre células adjacentes, seguidas pela adição de proteínas juncionais que se agrupam em junções estreitas e comunicantes (Citi, 1993; Cyr et al., 2007; Mège et al., 2006). Essas junções são formadas por complexos multiproteicos, incluindo CLDNs (*claudins*), ocludinas e moléculas de adesão juncional, bem como proteínas zona ocludentes intracelulares que interagem com o citoesqueleto de actina (Figura 4) (Cyr et al., 2018; Saitou et al., 2000).

As junções aderentes são formadas por caderinas, uma grande família de moléculas de adesão celular dependentes de cálcio, que medeiam interações homotípicas dependentes de cálcio entre células adjacentes (Figura 4) (Cyr et al., 2007; Takeichi, 2007). Adicionalmente, a ocludina, identificada como a primeira proteína transmembranar presente em junções estreitas, caracteriza-se por apresentar uma região C-terminal extracelular extensa e N-terminal intracelular reduzida, além de possuir duas alças extracelulares (Figura 4). A

interação entre as moléculas de ocludina de células adjacentes evidencia sua funcionalidade como componente das junções estreitas (Cyr et al., 2018, 2007; Saitou et al., 2000, 1998).

A identificação de uma segunda família de proteínas transmembrana das junções estreitas, conhecidas como CLDNs, revela a complexidade dessas estruturas. Foram identificadas 20 CLDNs, cuja distribuição nos tecidos é extensa e variada. No epidídimo, as CLDNs podem colocalizar com a ocludina; entretanto, na ausência da ocludina, ainda são recrutadas para as junções estreitas, indicando um papel crucial na sua formação (Cyr et al., 2007; Saitou et al., 2000). Neste contexto, a perda de uma única claudina, tal como CLDN1, CLDN3, CLDN4 ou CLDN7, em cultura de células da cabeça do epidídimo humano (FHCE1 - *fertile human caput epididymal cell line 1*), foi suficiente para desestabilizar as junções estreitas (Cyr et al., 2018; Dubé et al., 2010). Adicionalmente, uma linhagem celular desenvolvida a partir de um paciente com azoospermia obstrutiva, na qual a expressão de CLDNs foi drasticamente reduzida, as junções estreitas não se formaram *in vitro* (Cyr et al., 2018; Dube et al., 2010).

Além disso, a integridade da barreira hemato-epididimária é reduzida com o envelhecimento e é modulada pelos androgênios e pela via do TGFB (*transforming growth factor beta*) (Gregory & Cyr, 2014; Stammer et al., 2013). Toxinas do ambiente, tais como as PCBs (*polychlorinated biphenyls*), também têm a capacidade de alterar a função das junções estreitas do epidídimo, comprometendo a fertilidade masculina (Cai et al., 2013; Cyr et al., 2018). Alterações na barreira hemato-epididimária podem ser responsáveis pela formação de condições inflamatórias, como granulomas espermáticos. A ocorrência de granulomas está associada ao aumento da inflamação, que demonstrou inibir a expressão de proteínas de junção estreita em muitos tecidos, como no epidídimo, o que tornaria os espermatozoides em maturação vulneráveis ao ataque do sistema imunológico (Gregory & Cyr, 2014). Estudos apontam que no processo inflamatório o aumento de citocinas, como IL4 e IL13 (*interleukin 4* e *13*, respectivamente) alteram a expressão de CLDNs, ocludinas e caderinas, aumentando a permeabilidade da barreira epitelial nasossinusal (Gregory & Cyr, 2014; Wise et al., 2014).

Adicionalmente ao papel na manutenção da barreira hemato-epididimária, as junções estreitas também controlam a proliferação e diferenciação celular durante o desenvolvimento embrionário e a reparação tecidual (Breton et al., 2019; Lima et al., 2010; Sourisseau et al., 2006).

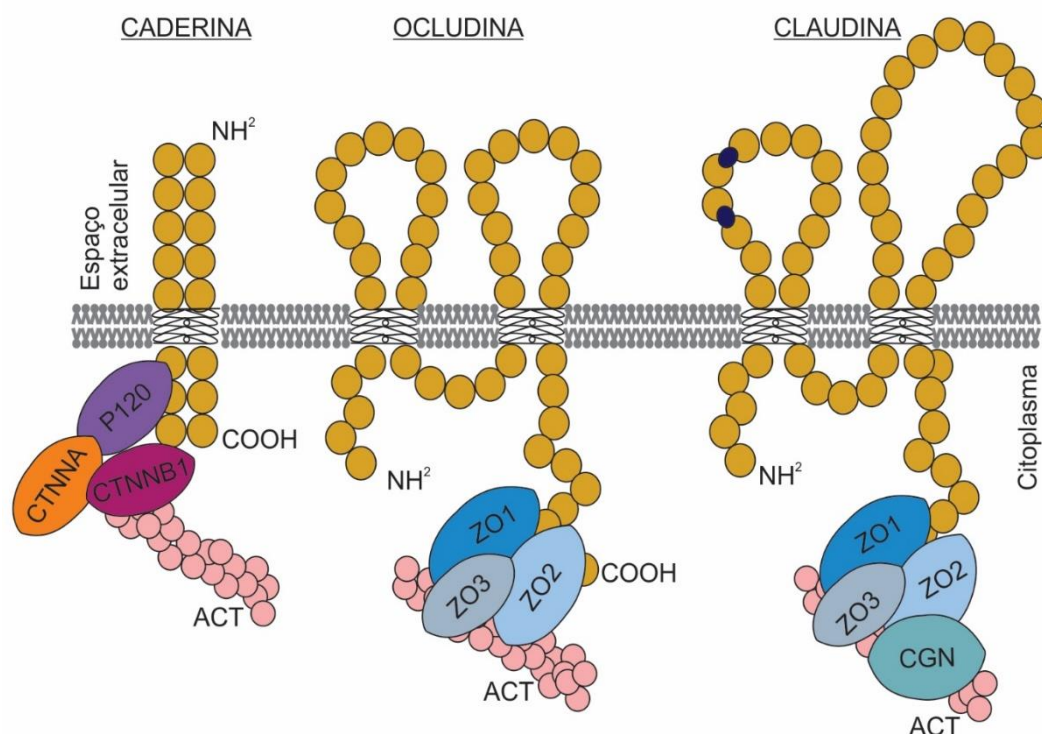


Figura 4. Representação esquemática das junções estreitas. Caderina, uma proteína transmembrana de passagem única, com a região extracelular e região intracelular, onde proteínas, como CTNNB1, CTNNA e família catenina p120 (P120 CTNN), desempenhando um papel na ligação de caderina ao citoesqueleto, implicando na sinalização intracelular. A ocludina, um membro da família TAMP, contém duas alças extracelulares de tamanho semelhante. O terminal intracelular interage com as proteínas ZO1, ZO2 e ZO3, que liga a ocludina ao filamento de ACT do citoesqueleto. As claudinas também possuem duas alças extracelulares, porém de tamanhos diferentes. A alça pequena contém moléculas de cisteína (círculo azul) que estabilizam a proteína. A porção intracelular da proteína liga-se à proteína ZO, bem como à CGN, que liga a proteína aos filamentos de ACT do citoesqueleto (figura de Cyr et al., 2018). ACT, *actin*; CGN, *cingulin*; CTNNA, *catenin alpha*; CTNNB1, *catenin beta 1*; TAMP, *tight junction-associated MARVEL proteins*; ZO, *zona occludens*.

Adicional à sua função de barreira, o epitélio epididimário representa a primeira linha de defesa contra infecções. Em alguns epitélios, como o do epidídimo, a resposta imunológica contra entidades não patogênicas deve ser equilibrada com tolerância imunológica afim de

evitar lesões excessivas no órgão (Battistone et al., 2023; Günther & Seyfert, 2018; Hedger, 2015; Voisin et al., 2019). Em particular, o epidídimo deve garantir a prevenção de respostas autoimunes contra espermatozoides autoantigênicos, ao mesmo tempo que fornece proteção contra patógenos ascendentes e sanguíneos (Schagdarsurengin et al., 2016; Fijak et al., 2018; Pleuger et al., 2020). Interessantemente estudo anteriores em roedores revelaram diferenças notáveis nas reações imunológicas das extremidades opostas do epidídimo em relação à infecção bacteriana ascendente e outros estímulos locais e sistêmicos (Figura 5) (Andrade et al., 2021; Klein et al., 2019, 2020; Michel et al., 2016; Silva et al., 2018; Wang et al., 2019; Wijayarathna et al., 2020).

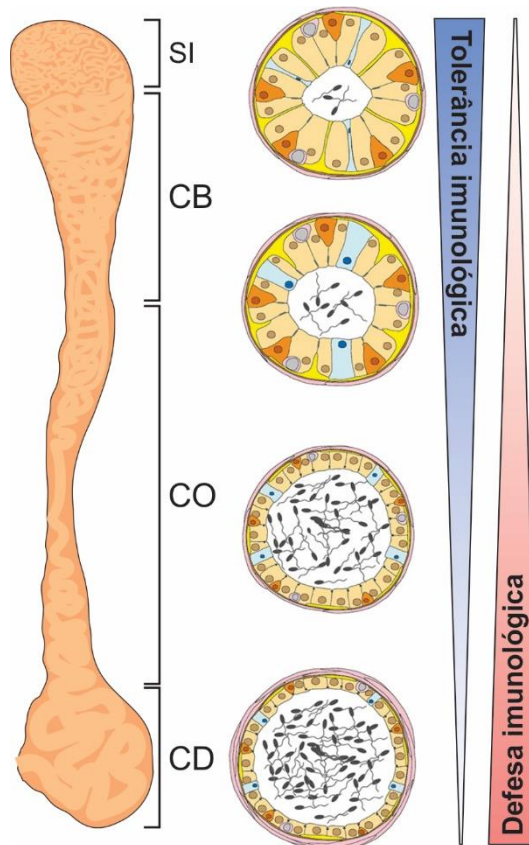


Figure 5. Visão geral esquemática das regiões do epidídimo de camundongo. Com base na estrutura e função o epidídimo é classicamente dividido em 4 regiões: SICBCO e CA. O epitélio do epidídimo consiste em diversos tipos de células (células principais, basais, halo, claras e estreitas), em que a composição do epitélio e diâmetro do lúmen mudam ao longo do comprimento do ducto. Para cumprir as principais funções imunológicas – tolerância imunológica nas regiões proximais e defesa imunológica nas regiões distais – os fagócitos mononucleares estão estrategicamente posicionados

entre células epiteliais adjacentes, apresentando longas projeções no segmento inicial, que vão diminuindo gradativamente em direção às regiões distais (figura adaptada de Pleuger et al., 2020). SI, segmento inicial; CB, cabeça; CO, corpo; CD, cauda do epidídimo.

No contexto imunológico, em relação às células epiteliais, vários mecanismos de defesa foram descritos. É importante ressaltar que a barreira imunológica é formada não apenas por células imunológicas, mas também por células epiteliais que desenvolveram sistemas de defesa. Neste contexto, estudos apontam uma rede diversificada de células imunológicas residentes no epidídimo, incluindo macrófagos, células dendríticas, linfócitos B e T e células NK, que estão presentes no compartimento epitelial, intersticial e luminal do epidídimo, apresentando diferenças em sua distribuição (Battistone et al., 2020; Da Silva et al., 2011; Da Silva & Smith, 2015; Mendelsohn et al., 2020; Pierucci-Alves et al., 2018; Shum et al., 2014; Smith et al., 2014; Voisin et al., 2018). Dentre estes, um subconjunto de fagócitos mononucleares constituem a maioria das células imunológicas residentes no epidídimo (Barrachina et al., 2022; Battistone et al., 2020; Da Silva et al., 2011; Mendelsohn et al., 2020; Voisin et al., 2018), sendo responsáveis pela manutenção homeostática dos tecidos e auxiliando a orquestrar a resposta imunológica inata após infecção ou lesão no epidídimo (Barrachina et al., 2022; Battistone et al., 2020; Pleuger et al., 2020; Wang et al., 2021). Na região proximal (segmento inicial e cabeça) do epidídimo, os fagócitos mononucleares apresentam projeções alongadas entre as células do epitélio em direção ao lúmen, enquanto na região distal (corpo e cauda do epidídimo) essas células ocupam a base do epitélio (Figura 6) (Barrachina et al., 2022; Da Silva et al., 2011; Mendelsohn et al., 2020; Smith et al., 2014; Voisin et al., 2018).

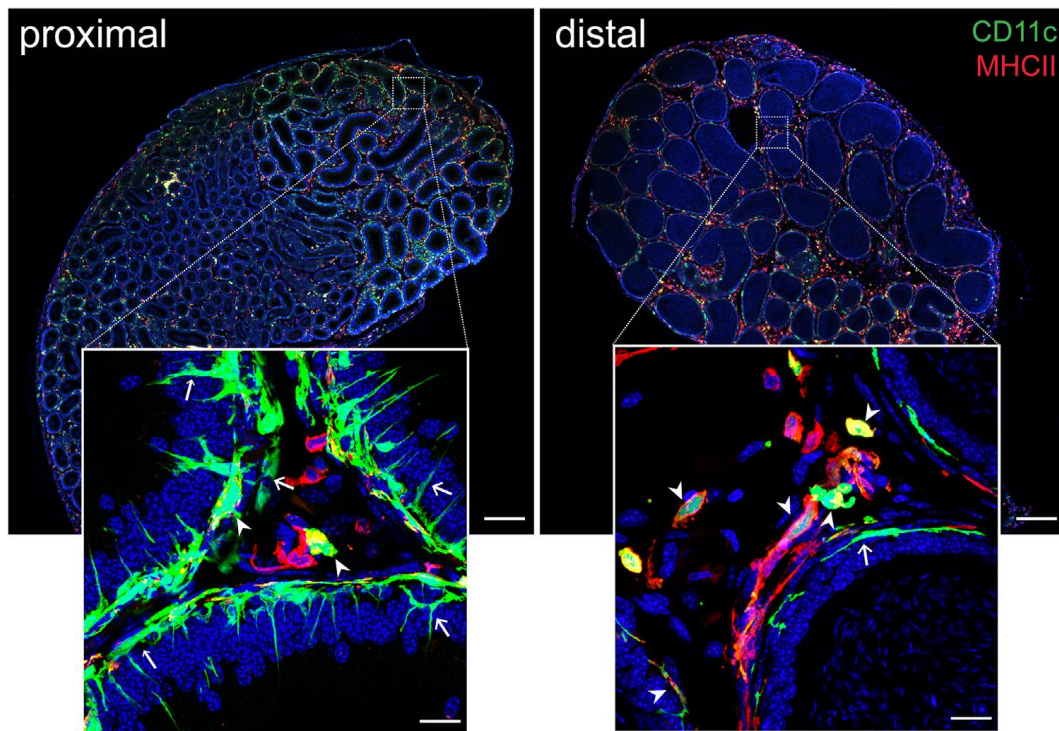


Figure 6. Localização dos fagócitos mononucleares na região proximal e distal do epidídimo. Fotografias de microscopia confocal mostrando dos fagócitos mononucleares CD11c+ (verde) e células MHCII+ (vermelho). Fagócitos mononucleares duplo positivo são mostrados em amarelo (cabeça de setas), enquanto os fagócitos mononucleares positivos apenas para CD11c são mostrados em verde (setas). Os núcleos são mostrados em azul (DAPI). Barra de escala de baixa ampliação = 100 μ m; barras de escala inseridas = 20 μ m (figura de Battistone et al., 2023; Mendelsohn et al., 2020).

Os fagócitos mononucleares residentes nos tecidos regulam o equilíbrio entre resposta imunológica efetora e a tolerância imunológica. De fato, estudos em imunologia reprodutiva se concentrando na elucidação dos papéis únicos dos fagócitos mononucleares na proteção dos espermatozoides e na compreensão de como o epidídimo enfrenta seus desafios imunológicos. Estudos recentes revelaram que as células imunológicas que povoam o epidídimo proximal e distal apresentam características funcionais e morfológicas distintas (Barrachina et al., 2022; Battistone et al., 2020; Mendelsohn et al., 2020; Pleuger et al., 2022; Voisin et al., 2018). Neste contexto, os fagócitos mononucleares apresentam especialização imunofuncional, com conjuntos de genes relacionados à atividade fagocítica e ao processamento e apresentação de antígenos, variando dependendo de sua localização no epidídimo (Battistone et al., 2020; Mendelsohn et al., 2020; Pleuger et al., 2022). Estudo

recente, utilizando *single-cell RNAseq*, identificou subgrupos de fagócitos mononucleares no epidídimo murino, organizados em diferentes nichos de acordo com suas propriedades homeostáticas, reparadoras e inflamatórias (Pleuger et al., 2022).

Adicionalmente às células imunológicas, o sistema imunológico inato fornece um mecanismo de defesa imediato após dano ou invasão de patógenos. 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). De fato, o epidídimo possui um vasto arsenal imunológico, com expressão abundante e constitutiva de diversos elementos do sistema imunológico inato, como PRRs (*pattern recognition receptors*), 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*) (Hedger, 2011; Silva et al., 2011; Ribeiro et al., 2015; Andrade et al., 2021).

A ativação de curto prazo do sistema imunológico inato é benéfica e fornece mecanismos citoprotetores para reparo tecidual (El-Zayat et al., 2019). No entanto, a ativação sustentada ou excessiva do sistema imunológico é prejudicial e pode levar a alterações irreversíveis na estrutura e função dos órgãos (Voisin et al., 2019; Wang et al., 2016). É reconhecido que desequilíbrios entre eventos pró- e anti-inflamatórios no epidídimo podem prejudicar a sua função e, conseqüentemente, a fertilidade. Investigar esse aspecto se torna ainda mais relevante visto que aproximadamente 15% dos casos de infertilidade masculina são de origem imunológica, associados a eventos autoimunes ou a quadros inflamatórios/infecciosos do trato reprodutor masculino (Schuppe et al., 2017; Fijak et al., 2018). Portanto, estudos que aprofundem o conhecimento sobre os mecanismos de disparo das respostas inflamatórias no epidídimo são importantes para elucidar as interações iniciais do sistema imunológico inato com o objetivo de prevenir a sustentação da resposta danosa e preservar a fertilidade masculina.

Imunidade inata do epidídimo: os receptores do tipo *Toll* (TLRs)

Como apresentado anteriormente, uma importante característica do epidídimo é seu número excepcionalmente elevado de componentes do sistema imunológico inato associado à detecção de patógenos, expressos abundantemente ao longo do tecido, na ausência de lesão ou infecção tecidual (Andrade et al., 2021; Hedger, 2011; Ribeiro et al., 2012, 2016). Assim como os NLRs (*NOD-like receptors*), os TLRs (*Toll-like receptors*) pertencem à família dos PRRs, já apresentados anteriormente, sendo receptores evolutivamente conservados, que desempenham um papel vital nas respostas imunológicas (Browne et al., 2018; Chapman et al., 2007; Cheng et al., 2016; Palladino et al., 2008, 2007; Rodrigues et al., 2008; Zhao et al., 2008; Zhu et al., 2015). Desempenhando um papel chave na imunidade inata, os TLRs detectam o agente patogênico e iniciam uma cascata de sinalização intracelular para a eventual eliminação do patógeno e das células infectadas (Takeda & Akira, 2015; Takeuchi & Akira, 2010). Para isto, os TLRs interagem com PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) derivados de vírus, bactérias, fungos e protozoários, além dos DAMPs (*danger-associated molecular patterns*), liberados durante os danos teciduais, atuando como a primeira barreira na defesa contra uma vasta gama de desafios (Sameer & Nissar, 2021; Takeda & Akira, 2015; Zindel & Kubes, 2020).

Os TLRs foram inicialmente identificados e caracterizados como um receptor essencial no embrião em desenvolvimento da *Drosophila*, sendo posteriormente descoberto seu envolvimento em respostas antifúngicas na mosca adulta (Anderson et al., 1985; Lemaitre et al., 1996). O primeiro homólogo de mamífero do receptor Toll da *Drosophila* foi identificado em 1997 como hToll, agora denominado como TLR4 (Medzhitov et al., 1997; Takeda & Akira, 2015). Categorizados como uma proteína transmembrana integral do tipo I, os TLRs possuem três domínios, sendo o primeiro um domínio de ligação ao ligante extracelular NTD (*N-terminal domain*), um segundo domínio transmembrana atravessando a membrana e um terceiro domínio intracelular CTD (*C-terminal domain*), domínio de homologia do receptor TIR (*Toll-IL-1 receptor*) (Figura 7) (Bell et al., 2003; Brennan & Gilmore, 2018; Gay et al., 2014; Sameer &

Nissar, 2021; Takeda & Akira, 2015, 2004). O domínio NTD apresenta uma estrutura solenoide dobrada, semelhante a uma ferradura, com cerca de 19-25 motivos curtos de LRRs (*leucine-rich repeat*), altamente conservadas, fornecendo a especificidade e capacidade de reconhecimento aos TLRs (Bell et al., 2003; Chang, 2010; Watters et al., 2007). A característica desses LRRs é o motivo da sequência de consenso - $L(X_2)LXL(X_2)NXL(X_2)L(X_7)L(X_2)$ - em que X pode ser qualquer aminoácido (Behzadi et al., 2021; Chang, 2010). A região LRR nos TLRs é separada da região transmembrana por um chamado "*LRR carboxy-terminal domain*", que é caracterizado pelo motivo de consenso $CXC(X_{23})C(X_{17})C$ (Medzhitov, 2001).

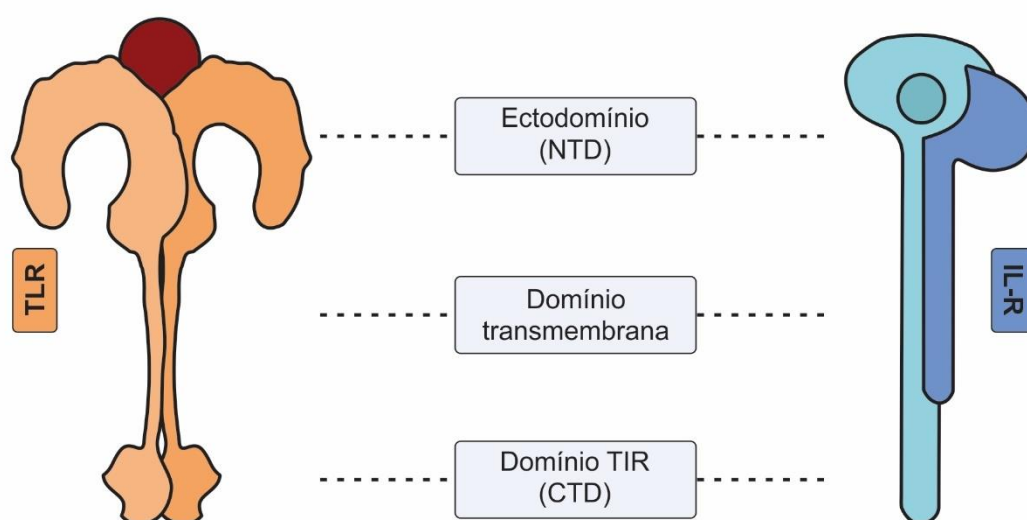


Figure 7. Representação comparativa entre a estrutura do receptor TLR e IL-R. Os TLRs são receptores transmembrana tipo 1 que contêm um domínio extracelular NTD de LRRs, uma região transmembrana e um domínio CTD. O domínio citoplasmático do TLR compartilha um alto grau de homologia com o IL-R e é, portanto, denominado domínio TIR (figura de Sameer & Nissar, 2021). CTD, *C-terminal domain*; IL-R, *IL-1 receptor*; LRRs, *leucine-rich repeat*; NTD, *N-terminal domain*; TIR, *Toll-IL-1 receptor*; TLR, *Toll-like receptor*.

Os mamíferos abrangem no máximo 13 subtipos de TLR, incluindo humanos (TLR1-10) e roedores - ratos e camundongos - (TLR1-13) (Behzadi & Behzadi, 2016; Fitzgerald & Kagan, 2020; Kawai & Akira, 2010; Kumar et al., 2009; Takeda & Akira, 2015). Em roedores a expressão diferencial de TLRs (TLR1 ao TLR11) foi observada em células imunológicas

(macrófagos e células dendríticas) e não-imunológicas (células epiteliais, intersticiais e da musculatura lisa) em diferentes tecidos do trato reprodutor masculino de roedores, incluindo testículo, epidídimo e próstata (Tabela 1) (Bhushan et al., 2008; Hedger, 2011; Palladino et al., 2007; Quintar et al., 2006; Rodrigues et al., 2008).

Tabela 1. Resumo da expressão dos TLRs no epidídimo de camundongos

Receptor	Ligante	Resposta	Epidídimo
TLR1/TLR2	Triacil lipoproteínas	Superfície celular	++
TLR2/TLR6	Diacil lipoproteínas, Zymosan, Glicolipídios, Âncora GPI, Fosfolipomanano	Superfície celular	++
TLR3	dsRNA	Endossomas	+++
TLR4	Lipopolissacarídeos, Mannan, Glicoinositolfosfolipídios, Âncora GPI	Superfície celular	++
TLR5	Flagelina	Superfície celular	+++
TLR7	ssRNA, Derivados de imidazoquinolina	Endossomas	+
TLR8	ssRNA	Endossomas	+/-
TLR9	Derivados de imidazoquinolina, DNA CpG, Hemozoína	Endossomas	++
TLR10 (humano)	Desconhecido	Superfície celular	+
TLR11	Proteína profilina do <i>Toxoplasma gondii</i> , <i>Escherichia coli</i> uropatogênica, <i>Salmonella flagellin</i>	Superfície celular	+++
TLR12	Proteína profilina do <i>Toxoplasma gondii</i>	ND	ND
TLR13	Bacterial23SribosomalRNA	ND	ND

Tabela adaptada de Hedger (2011) e Hutcheon et al., (2016). Os valores da tabela são subjetivos e baseados em dados apresentados em: (Bhushan et al., 2008; Palladino et al., 2008, 2007; Riccioli et al., 2006; Rodrigues et al., 2008; Zhao et al., 2008).

Os TLR são capazes de diferenciar moléculas microbianas de substâncias hospedeiras que compartilham semelhança estrutural substancial, o que é alcançado parcialmente por suas localizações celulares definidas e oligomerizações dinâmicas (Chang, 2010; Watters et al., 2007). A interação com ligantes, iniciado no domínio NTD, dispara um processo de multimerização (homo ou heterodimerização com ou sem correceptores) do TLR de membrana, recrutando adaptadores de sinalização, como MYD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*) e TICAM1 (*TIR domain containing adaptor molecule 1*), via interações do domínio CTD (TIR-TIR) (Chang, 2010; Fitzgerald & Kagan, 2020; Takeda & Akira, 2015). Dentre os TLRs, destacamos o TLR2, TLR4 e TLR6, devido aos seus papéis na detecção e disparo de respostas imunológicas contra infecções por Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, além de terem sua expressão descrita em células imunológicas (intersticiais) e não imunológicas (células epiteliais e da musculatura lisa) ao longo do epidídimo de ratos e camundongos (Cheng et al., 2016; Palladino et al., 2008; Rodrigues et al., 2008; Zhao et al., 2008).

O reconhecimento do LPS (*lipopolysaccharide*) de bactérias Gram-negativas pelo TLR4 requer um complexo multireceptor que consiste na interação do LPS com o LBP (*LPS-binding protein*) solúvel, que é uma proteína de transporte e que facilita a associação do LPS ao CD14 (*cluster differentiation 14*) (Akashi-Takamura & Miyake, 2008; Eckert et al., 2013; Qian & Cao, 2013; Schumann et al., 1990). Por sua vez, a proteína CD14 facilita a transferência do LPS ao complexo TLR4/MD2 (*myeloid differentiation factor 2*) modulando o reconhecimento do LPS (Akashi-Takamura & Miyake, 2008; da Silva Correia et al., 2001; Gioannini & Weiss, 2007; Lu et al., 2008; Miyake, 2004). A cascata de transferência LPS-LBP-CD14-MD2-TLR4 permite que a dimerização de TLR4 ocorra em concentrações de picomolar de LPS; além disso, milhares de moléculas de LPS podem ser extraídas de uma única bactéria Gram-negativa (Figura 8A,B) (Fitzgerald & Kagan, 2020; Gioannini & Weiss, 2007; Nagai et al., 2002; Park et al., 2009). Esse complexo ligante-receptor promove a ativação de vias de

sinalização mediadas por moléculas adaptadoras MYD88 (via canônica) e TICAM1 (via não-canônica), culminando na ativação de MAPKs (*mitogen-activated protein kinases*), como p38, ERK (*signal-regulated kinase*) e JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) e dos fatores de transcrição como o NFkB (*nuclear factor kappa B*), AP1 (*activator protein 1*) e IRF3 (*interferon-regulatory factor 3*), com consequente aumento da transcrição de genes envolvidos na resposta inflamatória e imunológica (El-Zayat et al., 2019; Qian & Cao, 2013).

Encontrado na membrana externa da maioria das bactérias Gram-negativas, o LPS é um PAMP bem caracterizado, com estrutura composta por três regiões. A primeira região é composta pelo Lipídeo A (endotoxina), que ancora o LPS na membrana externa da bactéria. A segunda região consiste em um núcleo central polissacarídeo que se liga ao lipídio A pelo KDO (*3-deoxy-D-manno-oct-2-ulosonic acid*). Por fim, a terceira região compreende o lipídio A contém duas glicosaminas fosforiladas ligadas a 6 cadeias lipídicas, que consiste no componente responsável pela atividade antigênica da endotoxina, ou seja, é o padrão molecular conservado responsável pela indução da resposta ao LPS (Maeshima & Fernandez, 2013; Park et al., 2009; Raetz & Whitfield, 2002).

Por sua vez, o TLR2 está envolvido no reconhecimento de uma ampla gama de PAMPs derivados de bactérias, fungos, parasitas e vírus (Akira et al., 2006). O TLR2 é capaz de formar heterodímero com outros TLRs, como o TLR1 e TLR6 (Fitzgerald & Kagan, 2020; Gay et al., 2014; Jin et al., 2007; Kang et al., 2009). O heterodímero TLR2/TLR6 interage com lipoproteínas da parede de bactérias Gram-positivas, como o LTA (*lipoteichoic acid*), resultando no recrutamento das proteínas acessórias CD14 ou CD36 e na ativação da via dependente de MYD88, mas não de TICAM1 (Figura 8 C,D) (Kang et al., 2009; Qian & Cao, 2013).

O LTA é um glicolípídeo de membrana de bactérias Gram-positivas que possui um grupo glicerol diacilado ligado a uma estrutura polissacarídica. Os grupos principais da sua estrutura podem variar; porém, a maioria dos patógenos Gram-positivos, incluindo *Streptococcus* dos grupos A e B, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus*

anthracis e *Listeria monocytogenes*, produzem LTA do mesmo tipo presente em *S. aureus* (Lu et al., 2009). Uma única cadeia de poli (glicerofosfato) não ramificada está covalentemente ligada a um glicolípido, que também ocorre entre os lipídios de membrana livres. A cadeia tem em média 25 resíduos de glicerofosfato de comprimento (Fischer, 1994; Kang et al., 2009; Lu et al., 2009).

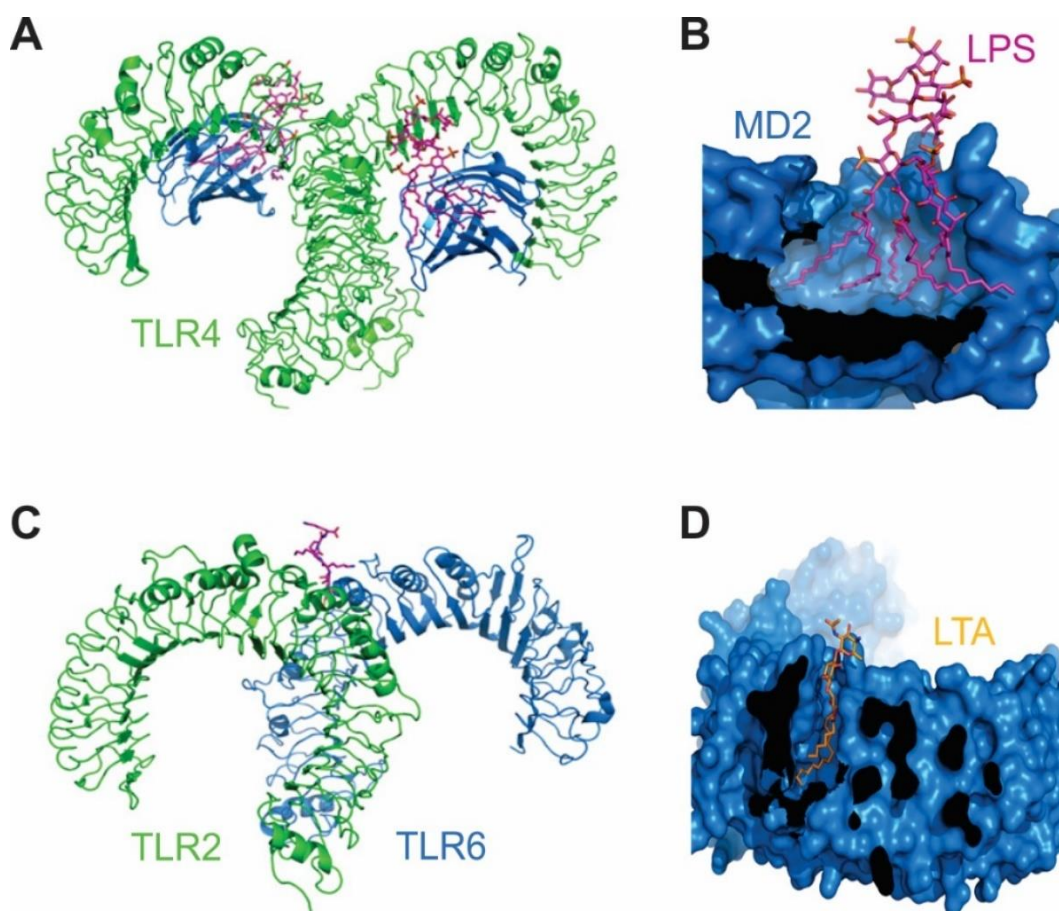


Figure 8. Estrutura geral dos complexos TLR4-LPS e TLR2/6-LTA. (A) Diagrama de fita de LPS (roxo) de ligação TLR4 (verde), MD2 (azul). (B) Seção transversal através da superfície molecular do complexo MD2-LPS. (C) Diagrama de fita de Pam2CSK4 (roxo), mimético ao LTA, de ligação ao TLR2/TLR6. (D) Seção transversal através da superfície molecular do complexo TLR2-LTA (laranja) (figuras adaptadas de Botos et al., 2011; Kang et al., 2009; Park et al., 2009). LPS, *lipopolysaccharide*; LTA, *lipoteichoic acid*; MD2, *myeloid differentiation factor 2*; TLR, *Toll-like receptor*.

Transdução de sinal da via TLR: ativação da via canônica (MYD88) e da via não-canônica (TICAM1)

MYD88 foi descrito pela primeira vez em 1990 como um gene positivamente regulado durante a diferenciação mieloide induzida por IL6, sendo posteriormente implicado na sinalização a jusante de IL1R e TLRs de mamíferos (Lord et al., 1990; Medzhitov et al., 1998; Muzio et al., 1997; Wesche et al., 1997). Utilizado por quase todos os TLRs, exceto pelo TLR3, MYD88 tem seu recrutamento para o domínio C-terminal do receptor TLR por duas importantes moléculas adaptadoras conhecidas como MAL (*myelin and lymphocyte protein*) e TIRAP (*TIR domain containing adaptor protein*). A MAL é utilizada por todos os tipos de receptores TLR para recrutar MYD88. Por outro lado, TLR1, TLR2 e TLR6 requerem a associação com a TIRAP para facilitar o contato com MYD88, resultando em uma cascata ao longo da via de sinalização, ativando a quinase IRAK4 (*interleukin 1 receptor associated kinase 4*), facilitando a fosforilação de IRAK1 (*interleukin 1 receptor associated kinases*) (Figura 9 A) (El-Zayat et al., 2019; Horng et al., 2002; Kumar et al., 2009; Qian & Cao, 2013). Em seguida, IRAK1 ativado associa-se ao TRAF6 (*TNF-receptor associated factor 6*), levando à ativação do complexo IKK (*I κ B kinase*) e do JNK (Chang, 2010; Sameer & Nissar, 2021; Takeda & Akira, 2015). Resultando no aumento da atividade de fatores de transcrição, como NF κ B e AP1 (Chang, 2010; Fujioka et al., 2004; Horng et al., 2002; Medzhitov et al., 1998; Qian & Cao, 2013; Takeda & Akira, 2015; Zhang et al., 2000).

A via não canônica TICAM1 é uma importante proteína adaptadora que medeia a sinalização independente de MYD88. Estudos utilizando camundongos nocautes para TICAM1 demonstraram um importante papel na ativação do fator de transcrição IRF3, e na ativação tardia de NF κ B e AP1 (Figura 9B) (Covert et al., 2005; Lu et al., 2008; Yamamoto et al., 2003). TICAM1 recruta outro complexo de sinalização composto por TRAF3/TBK1/IKKi (*TNF receptor associated factor 3/TANK binding kinase 1/IKK epsilon*) para fosforilar IRF3, induzindo a expressão de IFN (*interferon*) tipo I (Kawai & Akira, 2010; Qian & Cao, 2013).

Infecção com UPEC (*uropathogenic Escherichia coli*) em tecidos urogenitais, como testículo e bexiga, pode suprimir ativamente a sinalização dependente de MYD88 em diferentes níveis para prevenir a secreção de citocinas pró-inflamatórias pelas células testiculares, sendo a defesa imunológica inata mediada pela via não canônica (Bhushan et al., 2008; Hunstad David A. et al., 2005). O epidídimo de camundongos nocautes para MYD88, 7 dias após infecção por UPEC, apresentou resistência a fibrose tecidual em relação aos animais selvagens, destacando a importância da via MYD88 para a resposta do hospedeiro à UPEC (Michel et al., 2016; Shum et al., 2014). Estudos apontam que a UPEC possui mecanismos para prevenir a regulação positiva de *Myd88* (Rodrigues et al., 2008). Esses estudos apontam para uma regulação dinâmica da via de sinalização TLR, com caminhos alternativos que necessitam de elucidação para o melhor entendimento da fisiopatologia da epididimite.

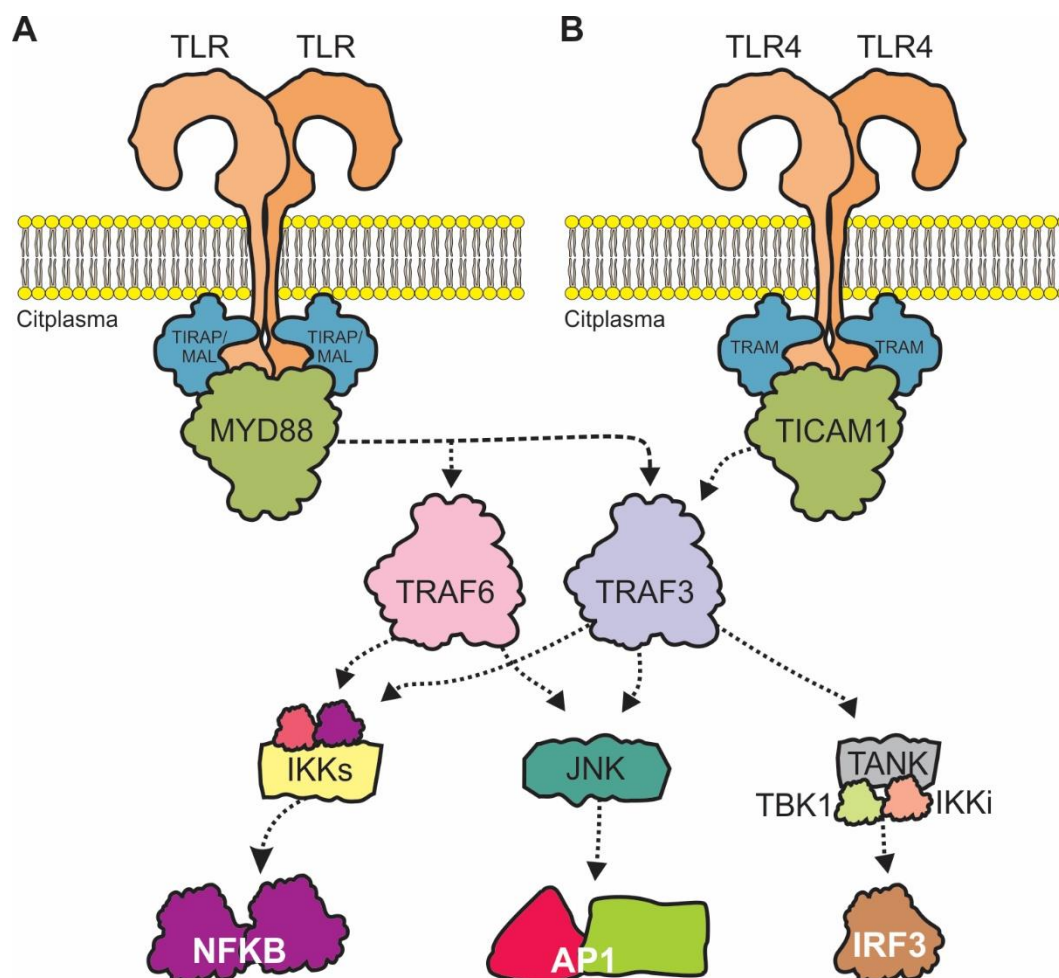


Figure 9. Representação esquemática das vias de sinalização TLR4 e TLR2/TLR6. Quando estimulado por LPS, o homodímero TLR4/TLR4 ativa a via de sinalização canônica, mediada por MYD88, que ativa o TRAF6. Paralelamente, a ativação da via não canônica é mediada pelo TICAM1 levando à ativação do TRAF3. O LTA liga-se ao heterodímero TLR2/TLR6, causando a ativação apenas da via canônica. Este processo resulta na ativação dos fatores de transcrição NFKB, AP1 e IRF3. (Adaptado de Andrade et al., 2024; Fitzgerald & Kagan, 2020; Lu et al., 2008). AP1, *activator protein 1*; IKK, *I κ B kinase*; IKKi, *IKK ϵ* ; IRF3, *interferon-regulatory factor 3*; JNK, *c-Jun N-terminal kinase*; MAL, *myelin and lymphocyte protein*; MYD88, *myeloid differentiation primary response gene 88*; NFKB, *nuclear factor kappa B*; TANK, *TRAF family-member-associated NFKB activator*; TBK1, *TANK binding kinase 1*; TICAM1, *TIR domain containing adaptor molecule 1*; TIRAP, *TIR domain containing adaptor protein*; TLR, *Toll-like receptor*; TRAF3, *TNF-receptor associated factor*; TRAM, *TRIF-related adaptor molecule*.

A epididimite

É reconhecido que qualquer desequilíbrio entre eventos pró- e anti-inflamatórios no epidídimo pode comprometer a sua função e, consequentemente, a fertilidade masculina. Embora uma proporção significativa dos casos de infertilidade masculina seja, de fato,

atribuída a causas inflamatórias ou imunológicas, os mecanismos celulares e moleculares básicos envolvidos na resposta do epidídimo em condições de inflamação ainda são pouco conhecidos (Avellar & Hinton, 2019; Hedger, 2011). 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 (Michel et al., 2015; Nicholson et al., 2010; Pilatz et al., 2015; Tracy et al., 2008).

A epididimite é uma condição comum, com dados epidemiológicos relatando uma incidência entre 250 a 650 por 100.000 homens/ano no Reino Unido e 600.000 casos/ano nos EUA (Çek et al., 2017; Fijak et al., 2018; Nicholson et al., 2010; Nickel et al., 2005). Até o momento, não existem dados epidemiológicos sobre a epididimite no Brasil. A maioria dos dados da doença é derivada da investigação de populações muito diferentes, onde a epididimite aguda, crônica e recorrente nem sempre estão estritamente separadas (Çek et al., 2017). Adicionalmente a inflamação pode propagar-se para o testículo, resultando em uma condição conhecida como "epidídimo-orquite", especialmente quando a terapia apropriada é postergada (Fijak et al., 2018). Em pacientes com epididimite isolada, a palpação do escroto é suficiente para o diagnóstico. Adicionalmente, ultrassonografia é recomendada em casos complicados, para investigações de acompanhamento, bem como para excluir torção testicular em homens jovens (Eickhoff et al., 1999; Fijak et al., 2018; Pilatz et al., 2013; Smith et al., 2013).

Usando métodos modernos de biologia molecular, os patógenos causadores da epididimite podem ser evidenciados em 87% dos pacientes que não receberam antibióticos e em 51% dos pacientes pré-tratados (Figura 10) (Dittmar et al., 2023; Pilatz et al., 2015). Como a ascensão retrograda via uretra de patógenos, como *E. coli*, *S. aureus* e *E. faecalis*, ou doenças sexualmente transmissíveis, como *Chlamydia trachomatis*, é a principal via de infecção, a análise bacteriana na urina/uretra é de extrema importância. As atuais diretrizes internacionais recomendam o diagnóstico de infecções sexualmente transmissíveis, bem

como a cultura de urina para uropatógenos clássicos (Fijak et al., 2018; Workowski et al., 2021).

Com alta prevalência em pacientes em idade reprodutiva, a epididimite pode causar profunda deterioração da qualidade dos parâmetros seminais (concentração, motilidade e morfologia espermática), juntamente com leucocitospermia pronunciada na fase aguda da doença (Fijak et al., 2018; Michel et al., 2015; Pilatz et al., 2015). De fato, cerca de 40% dos pacientes diagnosticados com epididimite bacteriana apresentam alterações persistentes de parâmetros espermáticos, como oligospermia ou azoospermia, 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).

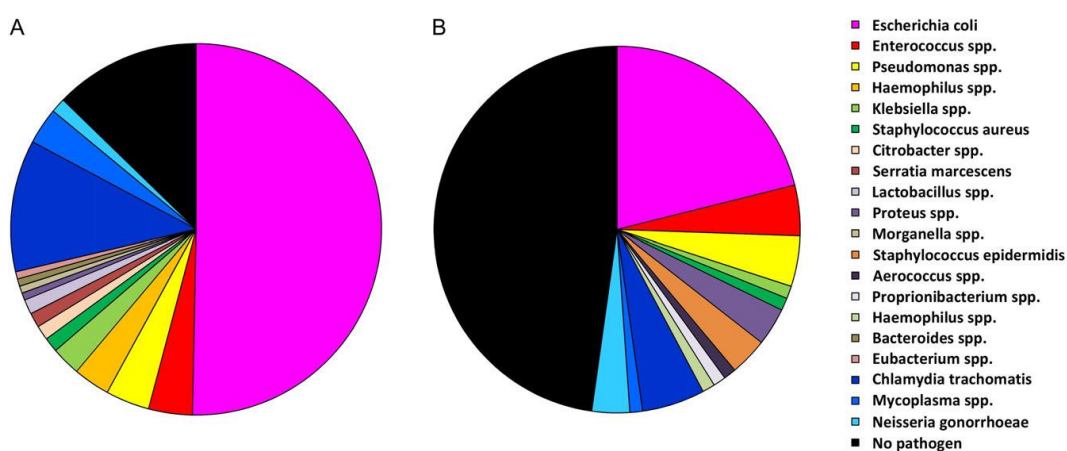


Figura 10. Espectro de patógenos em pacientes com epididimite aguda. A) Em pacientes sem pré-tratamento antimicrobiano (n = 157) patógenos bacterianos podem ser identificados em 87% dos casos. (B) Em pacientes com pré-tratamento antimicrobiano (n = 90) a detecção de patógenos só é possível em 51% dos casos (Fijak et al., 2018; Pleuger et al., 2020).

Modelos experimentais de epididimite

A realização de biópsias de epididimite bacteriana aguda é contraindicada para evitar o risco de disseminação descontrolada dos patógenos pela punção e danos irreversíveis ao órgão. Portanto, amostras de epididimite humana, as quais podem ser empregadas para investigar uma avaliação detalhada de alterações morfológicas e respostas inflamatórias, são escassas e a maioria já em estado avançado da doença (Fijak et al., 2018). Neste contexto, modelos animais de epididimite bacteriana aguda são os que mais se aproximam da situação clínica, sendo extremamente valiosos para a avaliação das respostas inflamatórias aguda e evolução natural da epididimite. Patógenos relevantes, vias de infecção, evolução temporal, danos observados e consequências para a fertilidade podem ser facilmente mimetizados *in vivo* ou mesmo em modelos de cultura de epidídimo (*ex vivo*) (Tabela 2) (Fijak et al., 2018; Michel et al., 2015).

Tabela 2. Modelos murinos de indução de epididimite

Animal	Agente indutor	Local da injeção	Referência
Rato	<i>E. coli</i>	Cauda do epidídimo unilateral	(Lucchetta et al., 1983)
Rato	<i>E. coli</i> (0:6)/(E-19)/(25922)/(CFT073)	Ducto deferente, unilateral	(Bhushan et al., 2011, 2008; Pilatz et al., 2015; Tanaka Kazushi et al., 1995; Turner et al., 2011)
Rato	<i>E. coli</i> (MTCC 729)	Ducto deferente bilateral	(Biswas et al., 2015)
Rato	LPS	Cabeça do epidídimo unilateral	(Cao et al., 2010)
Rato	LPS/LTA	Ducto deferente bilateral	(Silva et al., 2018)
Camundongo	<i>E. coli</i> (DH5α)	Epidídimo bilateral	(Fei et al. 2012)

Camundongo	<i>E. coli</i> / <i>E. coli</i> (CFT073)	Ducto deferente, bilateral	(Andrade et al., 2024; Klein et al., 2019; Lang et al., 2014, 2013; Michel et al., 2016; Pleuger et al., 2022)
Camundongo	LPS/LTA	Interstício segmento inicial bilateral	(Andrade et al., 2024, 2021)
Camundongo	LPS	Ducto deferente bilateral	(Andrade et al., 2024, 2021; Barrachina et al., 2022)
Camundongo	LPS	Cultura de célula epitelial	(Mühlbauer et al., 2008)
Camundongo	<i>E.coli</i>	Cultura organotípica	(Lang et al., 2014; Michel et al., 2016)
Camundongo	LPS	Cultura organotípica	(Andrade et al., 2024; Lang et al., 2014; Pleuger et al., 2022)

Tabela adaptada de Michel et al. (2015)
E. coli: *Escherichia coli*; LPS: lipopolissacarídeo; LTA: ácido lipoteicóico

A injeção intravasal retrógrada no ducto deferente em direção a cauda do epidídimo é considerada o modelo “padrão ouro” de epididimite, mimetizando o principal modo de infecção em homens (ou seja, a ascensão retrógrada de patógenos via uretra) e reproduz várias características observadas em cenários clínicos (Fijak et al., 2018; Michel et al., 2015). As lesões teciduais induzidas pela epididimite bacteriana, tipicamente observadas no epidídimo de homens e em modelos experimentais em roedores e lagomorfos, incluem infiltrado inflamatório intersticial, edema, destruição do epitélio e da musculatura lisa, fibrose intersticial e obstrução do ducto epididimário (Hackett et al., 1988; Michel et al., 2016; Silva et al., 2018; Stammier et al., 2015, 2015; Tanaka Kazushi et al., 1995; Turner et al., 2011). Entretanto, a literatura mostra uma diferença na responsividade da região proximal e distal do epidídimo após a injeção intravasal retrógrada de UPEC (Klein et al., 2020, 2019; Michel et al., 2016; Pleuger et al., 2022, 2020). Resposta diferenciais entre as regiões do epidídimo também foram

observadas em modelo de epidídimo-orquite autoimune em camundongos, demonstrando que a região proximal do epidídimo mantém não apenas a histologia relativamente integra, bem como a expressão gênica normal, ao contrário da região distal do epidídimo, que apresentou reação inflamatória e fibrótica grave (Wijayarathna et al., 2020).

Uma possível explicação para as diferenças das respostas imunológicas regionais do epidídimo está relacionada às exigências únicas do ambiente imunológico de cada segmento (Pleuger et al., 2020). Neste contexto, o estudo contemporâneo da resposta regionalizada do epidídimo frente a desafios infecciosos/inflamatórios ganha destaque. De fato, a estimulação direta do segmento inicial via injeção intersticial com LPS ultrapuro de *E. coli*, provoca uma resposta dependente da dose associada à regulação positiva de citocinas e ao recrutamento de células imunes (Andrade et al., 2021).

Padrões moleculares bacterianos purificados utilizados como indutores de epididimite em modelos de roedores representam ferramentas úteis para investigar a fisiopatologia da doença, uma vez que desencadeiam inflamação através da ativação seletiva de PRRs, tal como os TLRs (Andrade et al., 2021; Cheng et al., 2016; Rodrigues et al., 2008; Silva et al., 2018). A primeira demonstração de que a ativação do TLR4 pelo LPS foi suficiente para provocar epididimite veio através de um modelo de endotoxemia sistêmica induzida em rato (Rodrigues et al., 2008). Recentemente, demonstramos que a ativação do homodímero TLR4/TLR4 e do heterodímero TLR2/TLR6 pelo LPS de *E. coli* e LTA de *E. faecalis*, respectivamente, na cauda do epidídimo de ratos induziu aumento da expressão (RNAm e proteína) de um conjunto distinto de mediadores inflamatórios, sendo o LPS capaz de induzir resposta inflamatória mais robusta do que o LTA (Silva et al., 2018). Dentre os genes que tiveram expressão aumentada em resposta ao LPS, destacamos aqueles controlados pelo fator de transcrição NFkB, como citocinas pró-inflamatórias, incluindo *Il1b* (*interleukin 1 beta*) e *Il6* (*interleukin 6*), e *Nos2* (*nitric oxide synthase 2*), sugerindo o envolvimento do óxido nítrico no processo inflamatório agudo no epidídimo (Silva et al., 2018). Curiosamente, o LTA não foi capaz de estimular a produção e secreção de IL1B e IL6 no epidídimo. No entanto, o LTA,

mas não o LPS, induziu a expressão do gene que codifica a enzima *Ptgs1* (*prostaglandin-endoperoxide synthase 1*, também conhecida como *Cox1*) (Silva et al., 2018). Esse perfil diferencial de modulação de genes que codificam mediadores inflamatórios pelo LPS e LTA teve reflexo nos parâmetros espermáticos epididimários, visto que a contagem e tempo de trânsito espermático foram diferencialmente afetados pela resposta inflamatória a esses PAMPs (Silva et al., 2018). Além disso, o estímulo inflamatório com LPS regulou diferencialmente a expressão do locus *Wfdc*, importante família com papéis putativos na imunidade inata e fertilidade, no epidídimo proximal e distal de camundongos (Andrade et al., 2021). O estímulo inflamatório com LPS também diminui a expressão de membros da família das β -defensinas no epidídimo de ratos, tal como a SPAG11E, uma membro da família das β -defensinas especificamente expresso na região da cabeça do epidídimo, desempenhando papéis duplos na motilidade espermática e na imunidade inata do epidídimo sob condições fisiológicas (Cao et al., 2010). Em conjunto, esses dados indicam que o perfil de resposta celular e de expressão gênica varia de acordo com o TLR ativado, tempo e região, gerando eventos iniciais da resposta inflamatória do epidídimo que podem impactar na função do órgão. Entretanto, a sinalização celular disparada após a ativação seletiva de diferentes TLRs, em especial aqueles capazes de reconhecer produtos de origem bacteriana, no epidídimo ainda carece de elucidação.

Dados do nosso grupo e da literatura apontam para a importância da magnitude da resposta inflamatória no epidídimo contra estímulos inflamatórios/infecciosos para a indução de danos teciduais associados à infertilidade. Portanto, investigar a resposta inflamatória no epidídimo frente à ativação diferencial dos receptores TLR4/TLR4 e TLR2/TLR6 pelos seus respectivos agonistas de origem bacteriana, faz-se importante para compreender como o epidídimo modula seu “arsenal de defesa” de acordo com o estímulo inflamatório e região, buscando combater de forma efetiva a agressão sofrida e ao mesmo tempo proteger suas funções para assegurar a viabilidade de sua preciosa carga, o espermatozoide.

Referências

- Akashi-Takamura, S., Miyake, K., 2008. TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* 20, 420–425. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2008.07.001>
- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell* 124, 783–801. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.015>
- Anderson, K.V., Bokla, L., Nüsslein-Volhard, C., 1985. Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: The induction of polarity by the Toll gene product. *Cell* 42, 791–798. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(85\)90275-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(85)90275-2)
- Andrade, A.D., Almeida, P.G.C., Mariani, N.A.P., Freitas, G.A., Kushima, H., Filadelpho, A.L., Spadella, M.A., Avellar, M.C.W., Silva, E.J.R., 2021. Lipopolysaccharide-induced epididymitis modifies the transcriptional profile of Wfdc genes in mice. *Biol Reprod* 104, 144–158. <https://doi.org/10.1093/biolre/ioaa189>
- Andrade, A.D., Almeida, P.G.C., Mariani, N.A.P., Santos, N.C.M., Camargo, I.A., Martini, P.V., Kushima, H., Ai, D., Avellar, M.C.W., Meinhardt, A., Pleuger, C., Silva, E.J.R., 2024. Regional modulation of toll-like receptor signaling pathway genes in acute epididymitis in mice. *Andrology* 12, 1024–1037. <https://doi.org/10.1111/andr.13630>
- Arrighi, S., 2014. Are the basal cells of the mammalian epididymis still an enigma? *Reprod Fertil Dev* 26, 1061–1071.
- Avellar, M.C.W., Hinton, B.T., 2019. Epididymis, in: Huhtaniemi, I., Martini, L. (Eds.), *Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)*. Academic Press, Oxford, pp. 807–813. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65180-2>
- Bagnis, C., Marsolais, M., Biemesderfer, D., Laprade, R., Breton, S., 2001. Na⁺/H⁺-exchange activity and immunolocalization of NHE3 in rat epididymis. *Am J Physiol Renal Physiol* 280, F426–F436. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.280.3.F426>
- Barrachina, F., Ottino, K., Tu, L.J., Soberman, R.J., Brown, D., Breton, S., Battistone, M.A., 2022. CX3CR1 deficiency leads to impairment of immune surveillance in the epididymis. *Cell Mol Life Sci* 80, 15. <https://doi.org/10.1007/s00018-022-04664-w>
- Battistone, M.A., Elizagaray, M.L., Barrachina, F., Ottino, K., Mendelsohn, A.C., Breton, S., 2023. Immunoregulatory mechanisms between epithelial clear cells and mononuclear phagocytes in the epididymis. *Andrology*. <https://doi.org/10.1111/andr.13509>

- Battistone, M.A., Mendelsohn, A.C., Spallanzani, R.G., Brown, D., Nair, A.V., Breton, S., 2020. Region-specific transcriptomic and functional signatures of mononuclear phagocytes in the epididymis. *Mol Hum Reprod* 26, 14–29. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaz059>
- Battistone, M.A., Merkulova, M., Park, Y.-J., Peralta, M.A., Gombar, F., Brown, D., Breton, S., 2019. Unravelling purinergic regulation in the epididymis: activation of V-ATPase-dependent acidification by luminal ATP and adenosine. *J Physiol* 597, 1957–1973. <https://doi.org/10.1113/JP277565>
- Behzadi, E., Behzadi, P., 2016. The role of toll-like receptors (TLRs) in urinary tract infections (UTIs). *Cent European J Urol* 69, 404–410. <https://doi.org/10.5173/ceju.2016.871>
- Behzadi, P., García-Perdomo, H.A., Karpiński, T.M., 2021. Toll-Like Receptors: General Molecular and Structural Biology. *J Immunol Res* 2021, 9914854. <https://doi.org/10.1155/2021/9914854>
- Bell, J.K., Mullen, G.E.D., Leifer, C.A., Mazzoni, A., Davies, D.R., Segal, D.M., 2003. Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* 24, 528–533. [https://doi.org/10.1016/S1471-4906\(03\)00242-4](https://doi.org/10.1016/S1471-4906(03)00242-4)
- Belleannée, C., Labas, V., Teixeira-Gomes, A.-P., Gatti, J.L., Dacheux, J.-L., Dacheux, F., 2011. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *J Proteomics* 74, 59–78. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2010.07.013>
- Belleannée, C., Thimon, V., Sullivan, R., 2012. Region-specific gene expression in the epididymis. *Cell Tissue Res* 349, 717–731. <https://doi.org/10.1007/s00441-012-1381-0>
- Bhushan, S., Hossain, H., Lu, Y., Geisler, A., Tchatalbachev, S., Mikulski, Z., Schuler, G., Klug, J., Pilatz, A., Wagenlehner, F., Chakraborty, T., Meinhardt, A., 2011. Uropathogenic *E. coli* induce different immune response in testicular and peritoneal macrophages: implications for testicular immune privilege. *PLoS One* 6, e28452–e28452. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028452>
- 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. *J Immunol* 180, 5537–5547. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5537>
- Biswas, B., Bhushan, S., Rajesh, A., Suraj, S.K., Lu, Y., Meinhardt, A., Yenugu, S., 2015. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) induced antimicrobial gene expression in the male reproductive tract of rat: evaluation of the potential of Defensin 21 to limit infection. *Andrology* 3, 368–375. <https://doi.org/10.1111/andr.12012>

- Botos, I., Segal, D.M., Davies, D.R., 2011. The Structural Biology of Toll-like Receptors. *Structure* 19, 447–459. <https://doi.org/10.1016/j.str.2011.02.004>
- Brennan, J.J., Gilmore, T.D., 2018. Evolutionary Origins of Toll-like Receptor Signaling. *Mol Biol Evol* 35, 1576–1587. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy050>
- Breton, S., Brown, D., 2013. Regulation of Luminal Acidification by the V-ATPase. *Physiology* 28, 318–329. <https://doi.org/10.1152/physiol.00007.2013>
- Breton, S., Nair, A.V., Battistone, M.A., 2019. Epithelial dynamics in the epididymis: role in the maturation, protection, and storage of spermatozoa. *Andrology* 7, 631–643. <https://doi.org/10.1111/andr.12632>
- Breton, S., Ruan, Y.C., Park, Y.-J., Kim, B., 2016. Regulation of epithelial function, differentiation, and remodeling in the epididymis. *Asian Journal of Andrology* 18.
- Browne, J.A., Leir, S.-H., Eggener, S.E., Harris, A., 2018. Region-specific innate antiviral responses of the human epididymis. *Mol Cell Endocrinol* 473, 72–78. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.01.004>
- Cai, J., Wang, C., Huang, L., Chen, M., Zuo, Z., 2013. A Novel Effect of Polychlorinated Biphenyls: Impairment of the Tight Junctions in the Mouse Epididymis. *Toxicol Sci* 134, 382–390. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kft106>
- Cao, D., Li, Y., Yang, R., Wang, Y., Zhou, Y., Diao, H., Zhao, Y., Zhang, Y., Lu, J., 2010. Lipopolysaccharide-Induced Epididymitis Disrupts Epididymal Beta-Defensin Expression and Inhibits Sperm Motility in Rats. *Biol Reprod* 83, 1064–1070. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.082180>
- Carlin, R.W., Lee, J.H., Marcus, D.C., Schultz, B.D., 2003. Adenosine Stimulates Anion Secretion Across Cultured and Native Adult Human Vas Deferens Epithelia. *Biol Reprod* 68, 1027–1034. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.009381>
- Carvelli, L., Aguilera, A.C., Zyla, L., Pereyra, L.L., Morales, C.R., Hermo, L., Sosa, M.A., 2021. Castration causes an increase in lysosomal size and upregulation of cathepsin D expression in principal cells along with increased secretion of procathepsin D and prosaposin oligomers in adult rat epididymis. *PLoS One* 16, e0250454. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250454>
- Çek, M., Sturdza, L., Pilatz, A., 2017. Acute and Chronic Epididymitis. *Eur Urol Suppl* 16, 124–131. <https://doi.org/10.1016/j.eursup.2017.01.003>
- Chang, Z.L., 2010. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm Res* 59, 791–808. <https://doi.org/10.1007/s00011-010-0208-2>

- 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 Tract. *Biol Reprod* 76, 958–964. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059410>
- Cheng, L., Wu, H., Shi, L., Chen, Q., Wang, Q., Zhu, W., Zhao, X., Han, D., 2016. Toll-like receptors 4 and 5 cooperatively initiate the innate immune responses to Uropathogenic *Escherichia coli* infection in mouse epididymal epithelial cells. *Biol Reprod* 94. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.136580>
- Citi, S., 1993. The molecular organization of tight junctions. *J Cell Biol* 121, 485–489. <https://doi.org/10.1083/jcb.121.3.485>
- Cornwall, G.A., 2009. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 15, 213–227. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmn055>
- Cornwall, G.A., Vreeburg, J.T., Holland, M.K., Orgebin-Crist, M.-C., 1990. Interactions of Labeled Epididymal Secretory Proteins with Spermatozoa after Injection of 35S-Methionine in the Mouse. *Biol Reprod* 43, 121–129. <https://doi.org/10.1095/biolreprod43.1.121>
- Covert, M.W., Leung, T.H., Gaston, J.E., Baltimore, D., 2005. Achieving Stability of Lipopolysaccharide-Induced NF-κB Activation. *Science* 309, 1854–1857. <https://doi.org/10.1126/science.1112304>
- Cyr, D., Dufresne, J., Pillet, S., Alfieri, J., Hermo, L., 2001. Expression and Regulation of Metallothioneins in the Rat Epididymis. *J Androl* 22, 124–135. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2001.tb02162.x>
- Cyr, D.G., 2011. Connexins and pannexins. *Spermatogenesis* 1, 325–338. <https://doi.org/10.4161/spmg.1.4.18948>
- Cyr, D.G., Dufresne, J., Gregory, M., 2018. Cellular junctions in the epididymis, a critical parameter for understanding male reproductive toxicology. *Reprod Toxicol* 81, 207–219. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2018.08.013>
- Cyr, D.G., Gregory, M., Dubé, É., Dufresne, J., Chan, P.T.K., Hermo, L., 2007. Orchestration of occludins, claudins, catenins and cadherins as players involved in maintenance of the blood-epididymal barrier in animals and humans. *Asian J Androl* 9, 463–475. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00308.x>
- da Silva Correia, J., Soldau, K., Christen, U., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., 2001. Lipopolysaccharide Is in Close Proximity to Each of the Proteins in Its Membrane Receptor

- Complex: transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 276, 21129–21135. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009164200>
- Da Silva, N., Cortez-Retamozo, V., Reinecker, H.-C., Wildgruber, M., Hill, E., Brown, D., Swirski, F.K., Pittet, M.J., Breton, S., 2011. A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction* 141, 653–663. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0493>
- Da Silva, N., Smith, T.B., 2015. Exploring the role of mononuclear phagocytes in the epididymis. *Asian J Androl* 17.
- de Mello Santos, T., Hinton, B.T., 2019. We, the developing rete testis, efferent ducts, and Wolffian duct, all hereby agree that we need to connect. *Andrology* 7, 581–587. <https://doi.org/10.1111/andr.12631>
- DeFalco, T., Capel, B., 2009. Gonad Morphogenesis in Vertebrates: Divergent Means to a Convergent End. *Annu Rev Cell Dev Biol*. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.13350>
- Dittmar, F., Rosellen, J., Reiser, L., Fritzenwanker, M., Hauptmann, A., Diemer, T., Schuppe, H.-C., Wagenlehner, F., Pilatz, A., 2023. Comprehensive evaluation of hematospermia in patients with acute epididymitis compared to patients with isolated hematospermia. *Andrology*. <https://doi.org/10.1111/andr.13489>
- Domeniconi, R.F., Souza, A.C.F., Washington, A.M., Xu, B., Hinton, B.T., 2016. Is the Epididymis a Series of Organs Placed Side By Side? *Biol Reprod* 95. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.138768>
- Dubé, E., Chan, P.T.K., Hermo, L., Cyr, D.G., 2007. Gene Expression Profiling and Its Relevance to the Blood-Epididymal Barrier in the Human Epididymis. *Biol Reprod* 76, 1034–1044. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059246>
- Dubé, É., Dufresne, J., Chan, P.T.K., Hermo, L., Cyr, D.G., 2010. Assessing the Role of Claudins in Maintaining the Integrity of Epididymal Tight Junctions Using Novel Human Epididymal Cell Lines. *Biol Reprod* 82, 1119–1128. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.083196>
- Dube, E., Hermo, L., Chan, P.T.K., Cyr, D.G., 2010. Alterations in the Human Blood-Epididymis Barrier in Obstructive Azoospermia and the Development of Novel Epididymal Cell Lines from Infertile Men. *Biol Reprod* 83, 584–596. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.084459>
- Eckert, J.K., Kim, Y.J., Kim, J.I., Gürtler, K., Oh, D.-Y., Sur, S., Lundvall, L., Hamann, L., van der Ploeg, A., Pickkers, P., Giamarellos-Bourboulis, E., Kubarenko, A.V., Weber, A.N.,

- Kabesch, M., Kumpf, O., An, H.-J., Lee, J.-O., Schumann, R.R., 2013. The Crystal Structure of Lipopolysaccharide Binding Protein Reveals the Location of a Frequent Mutation that Impairs Innate Immunity. *Immunity* 39, 647–660. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.09.005>
- 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 Int* 84, 827–834. <https://doi.org/10.1046/j.1464-410x.1999.00252.x>
- El-Zayat, S.R., Sibaii, H., Mannaa, F.A., 2019. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent* 43, 187. <https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2>
- Fijak, M., Bhushan, S., Michel, V., Nicolas, N., Meinhardt, A., Pilatz, A., Schuppe, H.-C., Hedger, M.P., Tung, K.S.K., 2018. Infectious, inflammatory and ‘autoimmune’ male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice? *Hum Reprod Update* 24, 416–441. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmy009>
- Fischer, W., 1994. Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 183, 61–76. <https://doi.org/10.1007/BF00277157>
- Fitzgerald, K.A., Kagan, J.C., 2020. Toll-like receptors and the control of Immunity. *Cell* 180, 1044–1066. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041>
- Fujioka, S., Niu, J., Schmidt, C., Sclabas, G.M., Peng, B., Uwagawa, T., Li, Z., Evans, D.B., Abbruzzese, J.L., Chiao, P.J., 2004. NF- κ B and AP-1 connection: mechanism of NF- κ B-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol Cell Biol* 24, 7806–7819. <https://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7806-7819.2004>
- Gay, N.J., Symmons, M.F., Gangloff, M., Bryant, C.E., 2014. Assembly and localization of Toll-like receptor signalling complexes. *Nat Rev Immunol* 14, 546–558. <https://doi.org/10.1038/nri3713>
- Gioannini, T.L., Weiss, J.P., 2007. Regulation of interactions of Gram-negative bacterial endotoxins with mammalian cells. *Immunol Res* 39, 249–260. <https://doi.org/10.1007/s12026-007-0069-0>
- Gregory, M., Cyr, D.G., 2014. The blood-epididymis barrier and inflammation. *Spermatogenesis* 4, e979619–e979619. <https://doi.org/10.4161/21565562.2014.979619>

- Günther, J., Seyfert, H.-M., 2018. The first line of defence: insights into mechanisms and relevance of phagocytosis in epithelial cells. *Semin Immunopathol* 40, 555–565. <https://doi.org/10.1007/s00281-018-0701-1>
- Hannema, S.E., Print, C.G., Charnock-Jones, D.S., Coleman, N., Hughes, I.A., 2006. Changes in Gene Expression during Wolffian Duct Development. *Horm Res* 65, 200–209. <https://doi.org/10.1159/000092408>
- Hedger, M.P., 2015. The immunophysiology of male reproduction. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* 805–892. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00019-3>
- Hedger, M.P., 2011. Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *J Androl* 32, 625–640. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.012989>
- Hinton, B., Robaire, B., 2015. The Epididymis, in: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. Volume 1. pp. 691–771. <https://doi.org/10.1016/B978-012515400-0/50027-0>
- Hinton, B.T., Galdamez, M.M., Sutherland, A., Bomgardner, D., Xu, B., Abdel-Fattah, R., Yang, L., 2011. How Do You Get Six Meters of Epididymis Inside a Human Scrotum? *J Androl* 32, 558–564. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.013029>
- Hirashima, T., 2014. Pattern Formation of an Epithelial Tubule by Mechanical Instability during Epididymal Development. *Cell Rep* 9, 866–873. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.09.041>
- Horng, T., Barton, G.M., Flavell, R.A., Medzhitov, R., 2002. The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors. *Nature* 420, 329–333. <https://doi.org/10.1038/nature01180>
- Hunstad David A., Justice Sheryl S., Hung Chia S., Lauer Scott R., Hultgren Scott J., 2005. Suppression of bladder epithelial cytokine responses by Uropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* 73, 3999–4006. <https://doi.org/10.1128/iai.73.7.3999-4006.2005>
- Hutcheon, C., Paulvannan, P., Subramanian, N., 2016. Cytoplasmic Sensing in Innate Immunity, in: Bradshaw, R.A., Stahl, P.D. (Eds.), *Encyclopedia of Cell Biology*. Academic Press, Waltham, pp. 710–726. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-394447-4.30108-0>
- Imperato-McGinley, J., Sanchez, R.S., Spencer, J.R., Yee, B., Vaughan, E.D., 1992. Comparison of the effects of the 5 alpha-reductase inhibitor finasteride and the antiandrogen flutamide on prostate and genital differentiation: dose-response studies. *Endocrinology* 131, 1149–1156. <https://doi.org/10.1210/endo.131.3.1324152>

- Jacob, M., Yusuf, F., Jacob, H.J., 2012. Development, Differentiation and Derivatives of the Wolffian and Müllerian Ducts, in: Shigehito Yamada, Tetsuya Takakuwa (Eds.), *The Human Embryo*. IntechOpen, Rijeka, p. Ch. 9. <https://doi.org/10.5772/34351>
- Jelinsky, S.A., Brown, E.L., Wilson, E., Bang, H.J., Turner, T.T., Johnston, D.S., Kopf, G.S., Finger, J.N., Solarz, M.K., 2007. The Rat Epididymal Transcriptome: Comparison of Segmental Gene Expression in the Rat and Mouse Epididymides. *Biol Reprod* 76, 561–570. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.057323>
- Jeong, Y.-D., Park, Y.-J., Ko, Y.-G., Lee, S.-S., Lee, S.-H., Lee, J., Kim, K.-W., Kim, S.W., Kim, B., 2020. Development and Differentiation of Epididymal Epithelial Cells in Korean Native Black Goat. *Animals* 10. <https://doi.org/10.3390/ani10081273>
- Jin, M.S., Kim, S.E., Heo, J.Y., Lee, M.E., Kim, H.M., Paik, S.-G., Lee, H., Lee, J.-O., 2007. Crystal Structure of the TLR1-TLR2 Heterodimer Induced by Binding of a Tri-Acylated Lipopeptide. *Cell* 130, 1071–1082. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.09.008>
- 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 Epididymis. *Biol Reprod* 73, 404–413. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.039719>
- Johnston, D.S., Turner, T.T., Finger, J.N., Owscharuk, T.L., Kopf, G.S., Jelinsky, S.A., 2007. Identification of epididymis-specific transcripts in the mouse and rat by transcriptional profiling. *Asian J Androl* 9, 522–527. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00317.x>
- Joseph, A., Yao, H., Hinton, B.T., 2009. Development and morphogenesis of the Wolffian/epididymal duct, more twists and turns. *Dev Biol* 325, 6–14. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2008.10.012>
- Kang, J.Y., Nan, X., Jin, M.S., Youn, S.-J., Ryu, Y.H., Mah, S., Han, S.H., Lee, H., Paik, S.-G., Lee, J.-O., 2009. Recognition of Lipopeptide Patterns by Toll-like Receptor 2-Toll-like Receptor 6 Heterodimer. *Immunity* 31, 873–884. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2009.09.018>
- Kawai, T., Akira, S., 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 11, 373.
- Kim, B., Breton, S., 2016. The MAPK/ERK-Signaling Pathway Regulates the Expression and Distribution of Tight Junction Proteins in the Mouse Proximal Epididymis. *Biol Reprod* 94, 22, 1–12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.134965>

- Kim, B., Roy, J., Shum, W.W.C., Da Silva, N., Breton, S., 2015. Role of Testicular Luminal Factors on Basal Cell Elongation and Proliferation in the Mouse Epididymis. *Biol Reprod* 92, 9, 1–11. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.123943>
- Klein, B., Bhushan, S., Günther, S., Middendorff, R., Loveland, K.L., Hedger, M.P., Meinhardt, A., 2020. Differential tissue-specific damage caused by bacterial epididymo-orchitis in the mouse. *Mol Hum Reprod* 26, 215–227. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa011>
- Klein, B., Pant, S., Bhushan, S., Kautz, J., Rudat, C., Kispert, A., Pilatz, A., Wijayarathna, R., Middendorff, R., Loveland, K.L., Hedger, M.P., Meinhardt, A., 2019. Dexamethasone improves therapeutic outcomes in a preclinical bacterial epididymitis mouse model. *Hum Reprod* 34, 1195–1205. <https://doi.org/10.1093/humrep/dez073>
- Kumar, H., Kawai, T., Akira, S., 2009. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 388, 621–625. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.08.062>
- Kumar, M., Syed, S.M., Taketo, M.M., Tanwar, P.S., 2016. Epithelial Wnt/ β catenin signalling is essential for epididymal coiling. *Dev Biol* 412, 234–249. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2016.02.025>
- Lang, T., Dechant, M., Sanchez, V., Wistuba, J., Boiani, M., Pilatz, A., Stammeler, A., Middendorff, R., Schuler, G., Bhushan, S., Tchatalbachev, S., Wübbeling, F., Burger, M., Chakraborty, T., Mallidis, C., Meinhardt, A., 2013. Structural and Functional Integrity of Spermatozoa Is Compromised as a Consequence of Acute Uropathogenic E. coli-Associated Epididymitis. *Biol Reprod* 89. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.110379>
- Lang, T., Hudemann, C., Tchatalbachev, S., Stammeler, A., Michel, V., Aslani, F., Bhushan, S., Chakraborty, T., Renz, H., Meinhardt, A., 2014. Uropathogenic Escherichia coli modulates innate immunity to suppress Th1-mediated inflammatory responses during infectious epididymitis. *Infect Immun* 82, 1104–1111. <https://doi.org/10.1128/IAI.01373-13>
- Lee, V., Hinton, B.T., Hirashima, T., 2023. Collective cell dynamics and luminal fluid flow in the epididymis: A mechanobiological perspective. *Andrology*. <https://doi.org/10.1111/andr.13490>
- Leir, S.-H., Yin, S., Kerschner, J., Cosme, W., Harris, A., 2020. An atlas of human proximal epididymis reveals cell-specific functions and distinct roles for CFTR. *Life Sci Alliance* 3, e202000744. <https://doi.org/10.26508/lsa.202000744>
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.-M., Hoffmann, J.A., 1996. The Dorsoventral Regulatory Gene Cassette *spätzle/Toll/cactus* Controls the Potent Antifungal Response in *Drosophila* Adults. *Cell* 86, 973–983. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80172-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80172-5)

- Lima, W.R., Parreira, K.S., Devuyst, O., Caplanusi, A., N'Kuli, F., Marien, B., Van Der Smissen, P., Alves, P.M.S., Verroust, P., Christensen, E.I., Terzi, F., Matter, K., Balda, M.S., Pierreux, C.E., Courtoy, P.J., 2010. ZONAB Promotes Proliferation and Represses Differentiation of Proximal Tubule Epithelial Cells. *J Am Soc Nephrol* 21.
- Liu, M.-M., Feng, X.-L., Qi, C., Zhang, S.-E., Zhang, G.-L., 2024. The significance of single-cell transcriptome analysis in epididymis research. *Front Cell Dev Biol* 12.
- Lord, K., Hoffman-Liebermann, B., Liebermann, D., 1990. Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL6. *Oncogene* 5, 1095–1097.
- Lu, D., Wörmann, M.E., Zhang, X., Schneewind, O., Gründling, A., Freemont, P.S., 2009. Structure-based mechanism of lipoteichoic acid synthesis by *Staphylococcus aureus* LtaS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 1584–1589. <https://doi.org/10.1073/pnas.0809020106>
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., Ohashi, P.S., 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
- Lucchetta, R., Clavert, A., Meyer, J.M., Bollack, C., 1983. Acute experimental *E. coli* epididymitis in the rat and its consequences on spermatogenesis. *Urol Res* 11, 117–120. <https://doi.org/10.1007/BF00257715>
- Maeshima, N., Fernandez, R.C., 2013. Recognition of lipid A variants by the TLR4-MD-2 receptor complex. *Front Cell Infect Microbiol* 3, 3–3. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00003>
- Mandon, M., Hermo, L., Cyr, D.G., 2015. Isolated Rat Epididymal Basal Cells Share Common Properties with Adult Stem Cells1. *Biol Reprod* 93, 115, 1–15. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.133967>
- Medzhitov, R., 2001. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1, 135–145. <https://doi.org/10.1038/35100529>
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Janeway, C.A., 1997. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397. <https://doi.org/10.1038/41131>
- Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S., Janeway, C.A., 1998. MyD88 Is an Adaptor Protein in the hToll/IL-1 Receptor Family Signaling Pathways. *Mol Cell* 2, 253–258. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80136-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80136-7)
- Mège, R.-M., Gavard, J., Lambert, M., 2006. Regulation of cell–cell junctions by the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol* 18, 541–548. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2006.08.004>

- Mendelsohn, A.C., Sanmarco, L.M., Spallanzani, R.G., Brown, D., Quintana, F.J., Breton, S., Battistone, M.A., 2020. From initial segment to cauda: a regional characterization of mouse epididymal CD11c+ mononuclear phagocytes based on immune phenotype and function. *Am J Physiol Cell Physiol* 319, C997–C1010. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00392.2020>
- Michel, V., Duan, Y., Stoschek, E., Bhushan, S., Middendorff, R., Young, J.M., Loveland, K.L., Kretser, D.M.D., Hedger, M.P., Meinhardt, A., 2016. Uropathogenic *Escherichia coli* causes fibrotic remodelling of the epididymis. *J Pathol* 240, 15–24. <https://doi.org/10.1002/path.4748>
- Michel, V., Pilatz, A., Hedger, M.P., Meinhardt, A., 2015. Epididymitis: revelations at the convergence of clinical and basic sciences. *Asian J Androl* 17, 756–763. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.155770>
- Mital, P., Hinton, B.T., Dufour, J.M., 2011. The blood-testis and blood-epididymis barriers are more than just their tight junctions. *Biol Reprod* 84, 851–858. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.087452>
- Miyake, K., 2004. Innate recognition of lipopolysaccharide by Toll-like receptor 4–MD-2. *Trends Microbiol* 12, 186–192. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.02.009>
- Mühlbauer, M., Cheely, A.W., Yenugu, S., Jobin, C., 2008. Regulation and functional impact of lipopolysaccharide induced Nod2 gene expression in the murine epididymal epithelial cell line PC1. *Immunology* 124, 256–264. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02763.x>
- Murashima, A., Kishigami, S., Thomson, A., Yamada, G., 2015a. Androgens and mammalian male reproductive tract development. *Biochim Biophys Acta* 1849, 163–170. <https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2014.05.020>
- Murashima, A., Miyagawa, S., Ogino, Y., Nishida-Fukuda, H., Araki, K., Matsumoto, T., Kaneko, T., Yoshinaga, K., Yamamura, K., Kurita, T., Kato, S., Moon, A.M., Yamada, G., 2011. Essential Roles of Androgen Signaling in Wolffian Duct Stabilization and Epididymal Cell Differentiation. *Endocrinology* 152, 1640–1651. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1121>
- Murashima, A., Xu, B., Hinton, B.T., 2015b. Understanding normal and abnormal development of the Wolffian/epididymal duct by using transgenic mice. *Asian J Androl* 17.
- Muzio, M., Ni, J., Feng, P., Dixit, V.M., 1997. IRAK (Pelle) Family Member IRAK-2 and MyD88 as Proximal Mediators of IL-1 Signaling. *Science* 278, 1612–1615. <https://doi.org/10.1126/science.278.5343.1612>

- Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., Miyake, K., 2002. Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat Immunol* 3, 667–672. <https://doi.org/10.1038/ni809>
- 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. *Br J Gen Pract* 60, 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. *J Urol* 167, 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, 935–940. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2005.05.007>
- Nonogaki, T., Noda, Y., Narimoto, K., Shiotani, M., Mori, T., Matsuda, T., Yoshida, O., 1992. Localization of CuZn-superoxide dismutase in the human male genital organs. *Hum Reprod* 7, 81–85. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a137565>
- 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, 718–729. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0928>
- 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 Tract. *Biol Reprod* 76, 958–964. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.059410>
- Palladino, M.A., Savarese, M.A., Chapman, J.L., Dughi, M.-K., Plaska, D., 2008. Localization of Toll-like receptors on epididymal epithelial cells and spermatozoa. *Am J Reprod Immunol* 60, 541–555. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2008.00654.x>
- Papp, S., Robaire, B., Hermo, L., 1995. Immunocytochemical localization of the Ya, Yc, Yb1, and Yb2 subunits of glutathione S-transferases in the testis and epididymis of adult rats. *Microsc Res Tech* 30, 1–23. <https://doi.org/10.1002/jemt.1070300102>
- 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.

- Park, Y.-J., Battistone, M.A., Kim, B., Breton, S., 2017. Relative contribution of clear cells and principal cells to luminal pH in the mouse epididymis. *Biol Reprod* 96, 366–375. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.116.144857>
- 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. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53, 934–945.
- Pierucci-Alves, F., Midura-Kiela, M.T., Fleming, S.D., Schultz, B.D., Kiela, P.R., 2018. Transforming Growth Factor Beta Signaling in Dendritic Cells Is Required for Immunotolerance to Sperm in the Epididymis. *Front Immunol* 9.
- Pilatz, A., Hossain, H., Kaiser, R., Mankertz, A., Schüttler, C.G., Domann, E., Schuppe, H.-C., Chakraborty, T., Weidner, W., Wagenlehner, F., 2015. Acute epididymitis revisited: impact of molecular diagnostics on etiology and contemporary guideline recommendations. *Eur Urol* 68, 428–435. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.12.005>
- Pilatz, A., Wagenlehner, F., Bschleipfer, T., Schuppe, H.-C., Diemer, T., Linn, T., Weidner, W., Altinkilic, B., 2013. Acute epididymitis in ultrasound: Results of a prospective study with baseline and follow-up investigations in 134 patients. *Eur J Radiol* 82, e762–e768. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2013.08.050>
- Pinel, L., Mandon, M., Cyr, D.G., 2019. Tissue regeneration and the epididymal stem cell. *Andrology* 7, 618–630. <https://doi.org/10.1111/andr.12635>
- Pleuger, C., Ai, D., Hoppe, M.L., Winter, L.T., Bohnert, D., Karl, D., Guenther, S., Epelman, S., Kantores, C., Fijak, M., Ravens, S., Middendorff, R., Mayer, J.U., Loveland, K.L., Hedger, M., Bhushan, S., Meinhardt, A., 2022. The regional distribution of resident immune cells shapes distinct immunological environments along the murine epididymis. *eLife* 11, e82193. <https://doi.org/10.7554/eLife.82193>
- Pleuger, C., Silva, E.J.R., Pilatz, A., Bhushan, S., Meinhardt, A., 2020. Differential immune response to infection and acute inflammation along the epididymis. *Front Immunol* 11, 3125. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599594>
- Qian, C., Cao, X., 2013. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Ann N Y Acad Sci* 1283, 67–74. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06786.x>
- 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 Cells¹. *Biol Reprod* 75, 664–672. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.106.053967>

- Raetz, C.R.H., Whitfield, C., 2002. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu Rev Biochem* 71, 635–700. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.71.110601.135414>
- Ribeiro, C., Romano, R., Avellar, M.C., 2012. Beta-defensins in the epididymis: clues to multifunctional roles. *Anim Reprod* 9, 751–759.
- Ribeiro, C.M., Ferreira, L.G.A., Thimoteo, D.S., Smith, L.B., Hinton, B.T., Avellar, M.C.W., 2017. Novel androgen-induced activity of an antimicrobial β -defensin: Regulation of Wolffian duct morphogenesis. *Mol Cell Endocrinol* 442, 142–152. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.12.016>
- Ribeiro, C.M., Queiróz, D.B.C., Patrão, M.T.C.C., Denadai-Souza, A., Romano, R.M., Silva, E.J.R., Avellar, M.C.W., 2015. Dynamic changes in the spatio-temporal expression of the β -defensin SPAG11C in the developing rat epididymis and its regulation by androgens. *Mol Cell Endocrinol* 404, 141–150. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.013>
- 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 J Androl* 18, 323–328. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.168791>
- Riccioli, A., Starace, D., Galli, R., Fuso, A., Scarpa, S., Palombi, F., De Cesaris, P., Ziparo, E., Filippini, A., 2006. Sertoli Cells Initiate Testicular Innate Immune Responses through TLR Activation. *J Immunol* 177, 7122. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.10.7122>
- Rinaldi, V.D., Donnard, E., Gellatly, K., Rasmussen, M., Kucukural, A., Yukselen, O., Garber, M., Sharma, U., Rando, O.J., 2020. An atlas of cell types in the mouse epididymis and vas deferens. *eLife* 9, e55474. <https://doi.org/10.7554/eLife.55474>
- Robaire, B., Hamzeh, M., 2011. Androgen Action in the Epididymis. *J Androl* 32, 592–599. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.014266>
- Robaire, B., Viger, R.S., 1995. Regulation of Epididymal Epithelial Cell Functions. *Biol Reprod* 52, 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*. *Biol Reprod* 79, 1135–1147. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069930>
- Ruan, Y.C., Shum, W.W.C., Belleannée, C., Da Silva, N., Breton, S., 2012. ATP secretion in the male reproductive tract: essential role of CFTR. *J Physiol* 590, 4209–4222. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2012.230581>

- Ruan, Y.C., Wang, Y., Da Silva, N., Kim, B., Diao, R.Y., Hill, E., Brown, D., Chan, H.C., Breton, S., 2014. CFTR interacts with ZO-1 to regulate tight junction assembly and epithelial differentiation through the ZONAB pathway. *J Cell Sci* 127, 4396–4408. <https://doi.org/10.1242/jcs.148098>
- Rusz, A., Pilatz, A., Wagenlehner, F., Linn, T., Diemer, Th., Schuppe, H.C., Lohmeyer, J., Hossain, H., Weidner, W., 2012. Influence of urogenital infections and inflammation on semen quality and male fertility. *World J Urol* 30, 23–30. <https://doi.org/10.1007/s00345-011-0726-8>
- Saitou, M., Fujimoto, K., Doi, Y., Itoh, M., Fujimoto, T., Furuse, M., Takano, H., Noda, T., Tsukita, S., 1998. Occludin-deficient Embryonic Stem Cells Can Differentiate into Polarized Epithelial Cells Bearing Tight Junctions. *J Cell Biol* 141, 397–408. <https://doi.org/10.1083/jcb.141.2.397>
- Saitou, M., Furuse, M., Sasaki, H., Schulzke, J.-D., Fromm, M., Takano, H., Noda, T., Tsukita, S., 2000. Complex Phenotype of Mice Lacking Occludin, a Component of Tight Junction Strands. *Mol Biol Cell* 11, 4131–4142. <https://doi.org/10.1091/mbc.11.12.4131>
- Sameer, A.S., Nissar, S., 2021. Toll-Like Receptors (TLRs): Structure, Functions, Signaling, and Role of Their Polymorphisms in Colorectal Cancer Susceptibility. *Biomed Res Int* 2021, 1157023. <https://doi.org/10.1155/2021/1157023>
- Schagdarsurengin, U., Western, P., Steger, K., Meinhardt, A., 2016. Developmental origins of male subfertility: role of infection, inflammation, and environmental factors. *Semin Immunopathol* 38, 765–781. <https://doi.org/10.1007/s00281-016-0576-y>
- Schumann, R.R., Leong, S.R., Flaggs, G.W., Gray, P.W., Wright, S.D., Mathison, J.C., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., 1990. Structure and Function of Lipopolysaccharide Binding Protein. *Science* 249, 1429–1431. <https://doi.org/10.1126/science.2402637>
- Schuppe, H.-C., Pilatz, A., Hossain, H., Diemer, T., Wagenlehner, F., Weidner, W., 2017. Urogenital infection as a risk factor for male infertility. *Dtsch Arztebl Int* 114, 339–346. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2017.0339>
- Sedlacek, R.L., Carlin, R.W., Singh, A.K., Schultz, B.D., 2001. Neurotransmitter-stimulated ion transport by cultured porcine vas deferens epithelium. *Am J Physiol Renal Physiol* 281, F557–F570. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.2001.281.3.F557>
- Shima, Y., Miyabayashi, K., Haraguchi, S., Arakawa, T., Otake, H., Baba, T., Matsuzaki, S., Shishido, Y., Akiyama, H., Tachibana, T., Tsutsui, K., Morohashi, K., 2013. Contribution of

- Leydig and Sertoli Cells to Testosterone Production in Mouse Fetal Testes. *Mol Endocrinol* 27, 63–73. <https://doi.org/10.1210/me.2012-1256>
- Shum, W.W., Smith, T.B., Cortez-Retamozo, V., Grigoryeva, L.S., Roy, J.W., Hill, E., Pittet, M.J., Breton, S., Da Silva, N., 2014. Epithelial Basal Cells Are Distinct from Dendritic Cells and Macrophages in the Mouse Epididymis. *Biol Reprod* 90, 90, 1–10. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116681>
- Shum, W.W.C., Da Silva, N., Brown, D., Breton, S., 2009. Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell–cell crosstalk. *J Exp Biol* 212, 1753–1761. <https://doi.org/10.1242/jeb.027284>
- Shum, W.W.C., Da Silva, N., McKee, M., Smith, P.J.S., Brown, D., Breton, S., 2008. Transepithelial Projections from Basal Cells Are Luminal Sensors in Pseudostratified Epithelia. *Cell* 135, 1108–1117. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.10.020>
- Shum, W.W.C., Ruan, Y.C., Da Silva, N., Breton, S., 2011. Establishment of Cell-Cell Cross Talk in the Epididymis: Control of Luminal Acidification. *J Androl* 32, 576–586. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.012971>
- Silva, E.J.R., Queiróz, D.B.C., Rodrigues, A., Honda, L., Avellar, M.C.W., 2011. Innate Immunity and Glucocorticoids: Potential Regulatory Mechanisms in Epididymal Biology. *J Androl* 32, 614–624. <https://doi.org/10.2164/jandrol.111.013565>
- 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. *Sci Rep* 8, 103. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17944-4>
- Smith, R.P., Tracy, C.R., Kavoussi, P.K., Witmer, M.T., Costabile, R.A., 2013. The impact of color Doppler ultrasound on treatment patterns of epididymitis in a university-based healthcare system. *Indian J Urol* 29. <https://doi.org/10.4103/0970-1591.109979>
- Smith, T.B., Cortez-Retamozo, V., Grigoryeva, L.S., Hill, E., Pittet, M.J., Da Silva, N., 2014. Mononuclear phagocytes rapidly clear apoptotic epithelial cells in the proximal epididymis. *Andrology* 2, 755–762. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00251.x>
- Sourisseau, T., Georgiadis, A., Tsapara, A., Ali, R.R., Pestell, R., Matter, K., Balda, M.S., 2006. Regulation of PCNA and Cyclin D1 Expression and Epithelial Morphogenesis by the ZO-1-Regulated Transcription Factor ZONAB/DbpA. *Mol Cell Biol* 26, 2387–2398. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.6.2387-2398.2006>

- Spadella, M.A., Silva, E.J.R., Chies, A.B., Almeida, L.A. de, 2023. Insights Into Antioxidant Strategies to Counteract Radiation-Induced Male Infertility. *Antioxid Redox Signal*. <https://doi.org/10.1089/ars.2023.0282>
- Staack, A., Donjacour, A.A., Brody, J., Cunha, G.R., Carroll, P., 2003. Mouse urogenital development: a practical approach. *Differentiation* 71, 402–413. <https://doi.org/10.1046/j.1432-0436.2003.7107004.x>
- Stammler, A., Hau, T., Bhushan, S., Meinhardt, A., Jonigk, D., Lippmann, T., Pilatz, A., Schneider-Hüther, I., Middendorff, R., 2015. Epididymitis: ascending infection restricted by segmental boundaries. *Hum Reprod* 30, 1557–1565. <https://doi.org/10.1093/humrep/dev112>
- Stammler, A., Müller, D., Tabuchi, Y., Konrad, L., Middendorff, R., 2013. TGFβs Modulate Permeability of the Blood-Epididymis Barrier in an In Vitro Model. *PLoS One* 8, e80611. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080611>
- Sullivan, R., Légaré, C., Lamontagne-Proulx, J., Breton, S., Soulet, D., 2019. Revisiting structure/functions of the human epididymis. *Andrology* 7, 748–757. <https://doi.org/10.1111/andr.12633>
- Takahashi, Y., Kudo, R., Tadokoro, R., Atsuta, Y., 2018. Coordination between body growth and tissue growth: Wolffian duct elongation and somitogenesis proceed in harmony with axial growth. *Int J Dev Biol* 62, 79–84. <https://doi.org/10.1387/ijdb.170290yt>
- Takeda, K., Akira, S., 2015. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol* 109, 14.12.1-14.12.10. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1412s109>
- Takeda, K., Akira, S., 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 16, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.smim.2003.10.003>
- Takeichi, M., 2007. The cadherin superfamily in neuronal connections and interactions. *Nat Rev Neurosci* 8, 11–20. <https://doi.org/10.1038/nrn2043>
- Takeuchi, O., Akira, S., 2010. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell* 140, 805–820. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.022>
- Tanaka Kazushi, Fujisawa Masato, Arakawa Soichi, Kamidono Sadao, 1995. Local Expression of Cytokine Messenger RNA in Rat Model of Escherichia Coli Epididymitis. *J Urol* 154, 2179–2184. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)66724-7](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)66724-7)
- Thimon, V., Koukoui, O., Calvo, E., Sullivan, R., 2007. Region-specific gene expression profiling along the human epididymis. *Mol Hum Reprod* 13, 691–704. <https://doi.org/10.1093/molehr/gam051>

- Thong, A., Müller, D., Feuerstacke, C., Mietens, A., Stammeler, A., Middendorff, R., 2014. Neutral endopeptidase (CD10) is abundantly expressed in the epididymis and localized to a distinct population of epithelial cells – Its relevance for CNP degradation. *Mol Cell Endocrinol* 382, 234–243. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.09.027>
- Tracy, C.R., Steers, W.D., Costabile, R., 2008. Diagnosis and Management of Epididymitis. *Urol Clin North Am* 35, 101–108. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2007.09.013>
- Tsuji, M., Shima, H., Cunha, G.R., 1991. In Vitro Androgen-Induced Growth and Morphogenesis of the Wolffian Duct within Urogenital Ridge. *Endocrinology* 128, 1805–1811. <https://doi.org/10.1210/endo-128-4-1805>
- Turner, T.T., 2008. De graaf's thread: the human epididymis. *J Androl* 29, 237–250. <https://doi.org/10.2164/jandrol.107.004119>
- Turner, T.T., Bomgardner, D., Jacobs, J.P., Nguyen, Q.A., 2003. Association of segmentation of the epididymal interstitium with segmented tubule function in rats and mice. *Reproduction* 125. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1250871>
- 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, 1507.e9-1507.e14. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2011.02.037>
- Voisin, A., Saez, F., Drevet, J.R., Guiton, R., 2019. The epididymal immune balance: a key to preserving male fertility. *Asian J Androl* 21, 531–539. https://doi.org/10.4103/aja.aja_11_19
- Voisin, A., Whitfield, M., Damon-Soubeyrand, C., Goubely, C., Henry-Berger, J., Saez, F., Kocer, A., Drevet, J.R., Guiton, R., 2018. Comprehensive overview of murine epididymal mononuclear phagocytes and lymphocytes: Unexpected populations arise. *J Reprod Immunol* 126, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2018.01.003>
- Wang, F., Liu, W., Jiang, Q., Gong, M., Chen, R., Wu, H., Han, R., Chen, Y., Han, D., 2019. Lipopolysaccharide-induced testicular dysfunction and epididymitis in mice: a critical role of tumor necrosis factor alpha. *Biol Reprod* 100, 849–861. <https://doi.org/10.1093/biolre/iyoy235>
- Wang, M., Yang, Y., Cansever, D., Wang, Y., Kantores, C., Messiaen, S., Moison, D., Livera, G., Chakarov, S., Weinberger, T., Stremmel, C., Fijak, M., Klein, B., Pleuger, C., Lian, Z., Ma, W., Liu, Q., Klee, K., Händler, K., Ulas, T., Schlitzer, A., Schultze, J.L., Becher, B., Greter, M., Liu, Z., Ginhoux, F., Epelman, S., Schulz, C., Meinhardt, A., Bhushan, S., 2021. Two populations of self-maintaining monocyte-independent macrophages exist in adult

- epididymis and testis. PNAS 118, e2013686117.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2013686117>
- Wang, Y., Song, E., Bai, B., Vanhoutte, P.M., 2016. Toll-like receptors mediating vascular malfunction: Lessons from receptor subtypes. Pharmacol Ther 158, 91–100.
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.12.005>
- Watters, T.M., Kenny, E.F., O'Neill, L.A.J., 2007. Structure, function and regulation of the Toll/IL-1 receptor adaptor proteins. Immunol Cell Biol 85, 411–419.
<https://doi.org/10.1038/sj.icb.7100095>
- Welsh, M., Sharpe, R.M., Walker, M., Smith, L.B., Saunders, P.T.K., 2009. New Insights into the Role of Androgens in Wolffian Duct Stabilization in Male and Female Rodents. Endocrinology 150, 2472–2480. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0529>
- Wesche, H., Henzel, W.J., Shillinglaw, W., Li, S., Cao, Z., 1997. MyD88: An Adapter That Recruits IRAK to the IL-1 Receptor Complex. Immunity 7, 837–847.
[https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(00\)80402-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(00)80402-1)
- Wijayarathna, R., Pasalic, A., Nicolas, N., Biniwale, S., Ravinthiran, R., Genovese, R., Muir, J.A., Loveland, K.L., Meinhardt, A., Fijak, M., Hedger, M.P., 2020. Region-specific immune responses to autoimmune epididymitis in the murine reproductive tract. Cell Tissue Res. <https://doi.org/10.1007/s00441-020-03215-8>
- Wise, S.K., Laury, A.M., Katz, E.H., Den Beste, K.A., Parkos, C.A., Nusrat, A., 2014. Interleukin-4 and interleukin-13 compromise the sinonasal epithelial barrier and perturb intercellular junction protein expression. Int Forum Allergy Rhinol 4, 361–370.
<https://doi.org/10.1002/alr.21298>
- Workowski, K.A., Bachmann, L.H., Chan, P.A., Johnston, C.M., Muzny, C.A., Park, I., Reno, H., Zenilman, J.M., Bolan, G.A., 2021. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. MMWR Recomm Rep 70, 1–187.
<https://doi.org/10.15585/mmwr.rr7004a1>
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K., Akira, S., 2003. Role of Adaptor TRIF in the MyD88-Independent Toll-Like Receptor Signaling Pathway. Science 301, 640–643.
<https://doi.org/10.1126/science.1087262>
- Yefimova, M., Bourmeyster, N., Becq, F., Burel, A., Lavault, M.-T., Jouve, G., Veau, S., Pimentel, C., Jégou, B., Ravel, C., 2019. Update on the cellular and molecular aspects of

- cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and male fertility. *Morphologie* 103, 4–10. <https://doi.org/10.1016/j.morpho.2018.11.001>
- Zhang, J.-S., Feng, W.-G., Li, C.-L., Wang, X.-Y., Chang, Z.-L., 2000. NF- κ B Regulates the LPS-Induced Expression of Interleukin 12 p40 in Murine Peritoneal Macrophages: Roles of PKC, PKA, ERK, p38 MAPK, and Proteasome. *Cell Immunol* 204, 38–45. <https://doi.org/10.1006/cimm.2000.1690>
- 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. *Immunol Lett* 119, 84–90. <https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.05.002>
- Zhou, Q., Nie, R., Prins, G.S., Saunders, P.T.K., Katzenellenbogen, B.S., Hess, R.A., 2002. Localization of Androgen and Estrogen Receptors in Adult Male Mouse Reproductive Tract. *J Androl* 23, 870–881. <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.2002.tb02345.x>
- Zhu, W., Zhao, S., Liu, Z., Cheng, L., Wang, Q., Yan, K., Chen, Q., Wu, H., Han, D., 2015. Pattern recognition receptor-initiated innate antiviral responses in mouse epididymal epithelial cells. *J Immunol* 194, 4825. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402706>
- Zindel, J., Kubes, P., 2020. DAMPs, PAMPs, and LAMPs in Immunity and Sterile Inflammation. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 15, 493–518. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012419-032847>

Objetivos
