

RESSALVA

Atendendo solicitação da
autora, o texto completo desta
Dissertação será
disponibilizado somente a
partir de 11/07/2027.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



IB Instituto de
Biociências
Unesp Botucatu

Dissertação de Mestrado

Poliana Veneziano Martini

**Papel das Metaloproteinases de Matriz na Inflamação Epididimária Induzida por
Lipopolissacarídeo de *E. coli***

Botucatu, São Paulo

2025

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Instituto de Biociências de Botucatu

Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas

Dissertação de Mestrado

Poliana Veneziano Martini

**Papel das Metaloproteinases de Matriz na Inflamação Epididimária Induzida por
Lipopolissacarídeo de *E. coli***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas, Interunidades - Instituto de Biociências de Botucatu e Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"

Candidata: Poliana Veneziano Martini

Orientador: Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva

Coorientador: Dr. Célio Junior da Costa Fernandes

Botucatu, São Paulo

2025

São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho"
Institute of Biosciences of Botucatu
Institute of Biosciences, Humanities, and Exact Sciences
Graduate Program in Biomolecular and Pharmacological Sciences

Master's Degree Dissertation

Poliana Veneziano Martini

Role of Matrix Metalloproteinases in Lipopolysaccharide-induced Epididymal Inflammation

Master's Degree Dissertation submitted to the Graduate Program in Biomolecular and Pharmacological Sciences, Joint Institute of Biosciences of Botucatu and Institute of Biosciences, Humanities, and Exact Sciences, São Paulo State University "Júlio de Mesquita Filho"

Candidate: Poliana Veneziano Martini

Advisor: Erick José Ramo da Silva, Ph.D.

Co-advisor: Célio Junior da Costa Fernandes, Ph.D.

Botucatu, São Paulo

2025

Financial Support

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
(Process 88887.853956/2023-00)

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Process
2021/06718 and 2023/03529-4)

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, aos meus pais Petterson Martini e Patrícia Rodrigues Veneziano Martini, e ao meu irmão Pietro Veneziano Martini, por serem meu suporte em todas as fases da vida. Desde o início desta jornada, vocês estiveram ao meu lado, acreditando em mim mesmo quando eu duvidava, incentivando cada passo e celebrando cada pequena conquista como se fosse a maior de todas. Desde que ingressei na graduação, em 2019, enfrentamos juntos a distância e a saudade, mas o apoio e a força que sempre me deram nunca deixaram que eu me sentisse sozinha. Sou eternamente grata por ter vocês como minha família.

Agradeço aos meus avós, Mercedes Rodrigues Veneziano, Vicente José Veneziano e Maria Vascounto Martini, por todo amor, cuidado e apoio ao longo da minha vida. Vocês também sempre estiveram ao meu lado, torcendo por mim e me incentivando em cada etapa. Sou muito grata por tudo o que fizeram e continuam fazendo por mim.

Agradeço ao meu amor, João Pedro de Moraes Novaes, por ser meu companheiro de vida e meu porto seguro. Sua presença, mesmo quando à distância, foi fundamental para que eu conseguisse seguir em frente nos meus momentos mais desafiadores. Por me escutar, por me acolher com carinho e por estar sempre ao meu lado, oferecendo apoio, amor e palavras de encorajamento quando eu mais precisava. Sou imensamente grata por ter o privilégio de compartilhar a vida com você e por te ter ao meu lado.

Agradeço aos meus amigos, Debora Kazumi Maeda, Gustavo de Lima Palma, Caíque Rossini Rosa, Letícia Alves Bastos, Luís Filipe Nascimento, Gabriel Lorentz Rosa, e tantos outros que fazem parte de muitas boas memórias que tenho. Por também sempre vibrarem pelas minhas conquistas.

Agradeço aos meus companheiros de laboratório, que também são meus amigos para a vida, Juliana Quintaneiro Bizzotto, Natália Calixto Miranda Santos, Isabela Andrade de Camargo, Noemia Aparecida Partelli Mariani, Alexandre Dorth de Andrade, Beatriz Rezende Santos, Lucas Kenji Kouuti, Rafael Marques Torres e Célio Júnior da Costa Fernandes. Por todas as risadas e dias de trabalho difíceis que compartilhamos, e que com certeza tornou a minha jornada muito mais leve e divertida. Por me ajudarem em muitos experimentos e em todos os processos de elaboração do meu projeto. Sou muito privilegiada de ter sido tão acolhida por vocês em todos os meus anos de LFRA e por poder ter feito ciência com todos vocês.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Erick José Ramo da Silva, por ser uma inspiração em todos os sentidos. O senhor reavivou o meu amor pela ciência e pesquisa quando ingressei no laboratório e sou muito privilegiada de poder ter tido a sua orientação durante todo esse processo. Por todas as reuniões, conselhos, discussões de resultados e suporte que transformaram a minha perspectiva sobre a ciência e me fez aprender tanto. Por sempre acreditar no meu potencial e por ter me ajudado tanto durante o desenvolvimento desse projeto. É uma honra poder ter sido orientada pelo senhor desde a minha iniciação científica.

Agradeço a todos os docentes do departamento de Biofísica de Farmacologia, setor Farmacologia, Prof. Dr. André Sampaio Pupo, Prof. Dr. Carlos Alan Cândido Dias Junior, Prof. Dr. Luiz Claudio Di Stasi e Profa. Dra. Valéria Cristina Sandrim, que contribuíram para minha formação profissional.

Agradeço a todos os funcionários do Departamento de Biofísica e Farmacologia, Giovana, Ana Cristina Murcia de Souza e Silvia Helena Ramos. À Flávia Bessi C. Colenci, Paulo Cesar Mioni e Luiz A. de Oliveira, por cuidarem tão bem dos nossos animais no

biotério. Ao Hélio Kushima, por toda a ajuda durante todo o desenvolvimento do meu projeto, e principalmente por todos os experimentos de ELISA que fizemos juntos.

Agradeço aos nossos animais do biotério, porque sem eles esse projeto de pesquisa não teria sido possível.

Agradeço ao Instituto de Biociências de Botucatu e à UNESP por ter me permitido viver uma experiência tão especial durante a minha pós-graduação.

Agradeço aos professores que integraram minha banca de Qualificação e Dissertação de Mestrado pelas valiosas contribuições, pelas discussões científicas e pelas orientações que enriqueceram de forma significativa este trabalho.

Agradeço as agências de fomento, CAPES, FAPESP e CNPq, pelo apoio da bolsa e auxílio financeiro prestado que tornaram possível a minha jornada com esse projeto.

Summary

Resumo	1
Abstract	2

Chapter 1: Introduction

Introduction	3
Structure and function of the epididymis	4
Pathophysiology and experimental models of epididymitis	7
Innate immune response of the epididymis to LPS: the role of Toll-like receptor 4 (TLR4)	13
The potential role of MMPs in the pathophysiology of epididymitis	17
References	21

Chapter 2: Aims

General Aim	28
Specific Aims	28

Chapter 3: Matrix Metalloproteinases responses in epididymitis

Graphical Abstract	30
Abstract	30
Introduction	31
Material and Methods	33
Animals	33
Experimental model of epididymitis	34
Reverse transcriptase reaction, conventional PCR, and real-time qPCR	35
Zymography assays	35
ELISA assays	36
Statistical Analysis	37
Results	37
LPS differentially modulated the transcript levels of Mmp2, Mmp7, Mmp9, Mmp13, and their inhibitors (Timp1–4 and Reck) in the initial segment and cauda epididymidis	37
LPS increased the activity of MMP2, MMP9, and MMP13 in the initial segment and cauda epididymidis	41
Doxycycline attenuated LPS-induced MMPs activity and cytokine responses to LPS in a region-specific manner	43
Discussion	46
Acknowledgments	51
Conflict of interest	51
Authors Contributions	51
References	52
Supplementary Material for Temporal and Region-specific Dynamics of Matrix Metalloproteinases Modulation in a Mouse Model of Lipopolysaccharide-induced Epididymitis	58

Chapter 4: Conclusion & Perspectives

Conclusion & Perspectives	66
---------------------------	----

Chapter 5: Appendix

Curriculum Vitae	67
Regional modulation of toll-like receptor signaling pathway genes in acute epididymitis in mice	72

Resumo

A epididimite, uma condição inflamatória que acomete o epidídimo, representa uma ameaça significativa à fertilidade e saúde masculina. Infecções bacterianas constituem o fator etiológico mais comum da epididimite, podendo levar à infiltração de células inflamatórias, edema, destruição de células epiteliais e musculares lisas, além de fibrose intersticial, geralmente observada na região da cauda do epidídimo. É importante salientar que essas alterações podem comprometer os parâmetros espermáticos, causando redução da concentração e motilidade e alterações da morfologia dos espermatozoides, além da presença de leucocitospermia, impactando negativamente a qualidade do sêmen. Tais alterações podem culminar em quadros de infertilidade temporária ou permanente. Nesse contexto, a fibrose intersticial, caracterizada pelo acúmulo de tecido fibroso formado por componentes da matriz extracelular (MEC), evidencia o potencial de sequelas de longo prazo associadas à epididimite. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são reguladoras fundamentais do remodelamento do tecido fibrótico e degradação da MEC, além de atuarem no tráfego de células imunológicas e modificações pós-traducionais de mediadores inflamatórios (p.ex., citocinas) durante a inflamação. No entanto, o papel das MMPs na epididimite permanece pouco explorado. Nesse estudo, investigamos se a epididimite induzida por lipopolissacarídeo (LPS) de *E. coli* altera a expressão e atividade de diferentes MMPs (MMP2, MMP7, MMP9 e MMP13) e seus inibidores teciduais (TIMP1-4, RECK) em camundongos. Além disso, investigamos se a doxíciclina, um antibiótico bacteriostático com atividade inibitória não-seletiva de MMPs, comumente prescrito para o tratamento de infecções, incluindo as do trato reprodutor masculino, é capaz de modular a resposta inflamatória e a atividade das metaloproteinases no epidídimo. A epididimite foi induzida por injeção de LPS ultrapuro de *E. coli* (50 µg) no compartimento intersticial do segmento inicial e da cauda do epidídimo. Além disso, camundongos adicionais foram tratados com doxíciclina (50 mg/kg/dia, i.p.) previamente à indução de epididimite. No segmento inicial, o LPS induziu um aumento da expressão do transcrito *Mmp13* em 6 h pós-indução e de *Mmp9* em 24 h, 72 h e 7 dias, em comparação ao controle salina. Também nessa região, observou-se aumento bifásico da expressão do transcrito *Timp1* em 6 h, 24 h e 7 dias, além de aumento tardio dos transcritos *Timp3* em 7 dias e *Reck* em 72 h e 7 dias. Na cauda do epidídimo, o LPS promoveu aumento bifásico dos transcritos *Mmp13* em 6 h e *Timp1* e *Mmp7* em 24 h e em 7 dias. Em paralelo, observou-se aumento do transcrito *Reck* apenas em 24 h, e dos transcritos *Mmp9* e *Mmp2* em 72 h e 7 dias. A análise por zimografia e ELISA confirmou que o LPS foi capaz de aumentar a atividade de MMP13 apenas em 6 h no segmento inicial, e de MMP2 e MMP9 em 72 h e 7 dias, tanto no segmento inicial quanto na cauda do epidídimo. A atividade de MMP2 e MMP9 induzida pelo LPS foi inibida pelo tratamento com doxíciclina no segmento inicial em 7 dias pós-infecção. Simultaneamente, o tratamento com doxíciclina também impediu o aumento da expressão das citocinas *Il6*, *Tnf* e *Il1b* induzido pelo LPS, tanto no segmento inicial quanto na cauda do epidídimo. Esses achados sugerem que as MMPs atuam como moduladores na epididimite induzida por LPS de forma dependente da região inflamada, com a MMP13 atuando precocemente e a MMP2 e MMP9 como mediadoras tardias. Nossos resultados destacam que a inibição das MMPs surge como uma nova estratégia terapêutica para atenuar os efeitos negativos da epididimite sobre a fertilidade masculina.

Palavras-chave: Inflamação, Epididimite, Metaloproteinases de Matriz, Doxíciclina, Fibrose.

Abstract

Epididymitis, an inflammatory condition affecting the epididymis, represents a significant threat to male fertility and health. Bacterial infections are the most common etiological factor of epididymitis and can lead to infiltration of inflammatory cells, edema, destruction of epithelial and smooth muscle cells, as well as interstitial fibrosis, which is usually observed in the distal region of the epididymis. These alterations can impair spermatozoa parameters, leading to reduced concentration and motility, abnormal morphology, and leukocytospermia, thereby negatively impacting semen quality. Such dysfunctions may result in temporary or permanent infertility. In this context, interstitial fibrosis, characterized by the accumulation of fibrotic tissue composed of extracellular matrix components, highlights the potential for long-term sequelae associated with epididymitis. Matrix metalloproteinases (MMPs) are key regulators of fibrotic tissue remodeling and extracellular matrix degradation and also participate in immune cell trafficking and post-translational modifications of inflammatory mediators (e.g., cytokines) during inflammation. However, the role of MMPs in epididymitis remains poorly understood. In this study, we investigated whether epididymitis induced by lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* alters the expression and activity of different MMPs (MMP2, MMP7, MMP9, and MMP13) and their tissue inhibitors (TIMP1–4, RECK) in mice. Additionally, we evaluated whether doxycycline, a bacteriostatic antibiotic with broad-spectrum MMP-inhibitory activity that is commonly prescribed for male reproductive tract infections, is capable of modulating the inflammatory response and MMP activity in the epididymis. Epididymitis was induced by injecting ultrapure LPS (50 µg) into the interstitial compartment of the initial segment and cauda epididymidis. Additional mice were treated with doxycycline (50 mg/kg/day, i.p.) prior to epididymitis induction. In the initial segment, LPS induced an early upregulation of *Mmp13* transcript expression at 6 h post-induction and a late increase in *Mmp9* at 24 h, 72 h, and 7 days compared to saline controls. In this same region, a biphasic upregulation of *Timp1* expression was observed at 6 h, 24 h, and 7 days, along with a late upregulation of *Timp3* at 7 days and *Reck* at 72 h and 7 days. In the cauda epididymidis, LPS promoted a biphasic upregulation of *Mmp13* at 6 h and *Timp1* and *Mmp7* at 24 h and 7 days. Concurrently, *Reck* transcript levels increased only at 24 h, whereas *Mmp9* and *Mmp2* were upregulated at 72 h and 7 days. Zymography and ELISA analyses confirmed that LPS increased MMP13 activity at 6 h in the initial segment and MMP2 and MMP9 at 72 h and 7 days in both the initial segment and cauda epididymidis. LPS-induced MMP2 and MMP9 activity was inhibited by doxycycline treatment, primarily in the initial segment at 7 days post-infection. At the same time, doxycycline treatment also prevented the LPS-induced increase in *Il6*, *Tnf*, and *Il1b* expression in both the initial segment and cauda epididymidis. These findings suggest that MMPs function as modulators in LPS-induced epididymitis in a region-specific manner, with MMP13 acting in the early responses and MMP2 and MMP9 serving as late mediators. Our results highlight that MMP inhibition emerges as a promising therapeutic strategy to reduce the detrimental effects of epididymitis on male fertility.

Key words: Inflammation, Epididymitis, Matrix Metalloproteinases, Doxycycline, Fibrosis.

Chapter 1

Introduction

Introduction

In the present work, submitted as part of the Master's Degree Dissertation of the Master's student Poliana Veneziano Martini, enrolled in the Graduate Program in Biomolecular and Pharmacological Sciences (PPG-CBF) – a joint program between the Institute of Biosciences, Letters and Exact Sciences (IBILCE), São José do Rio Preto, and the Institute of Biosciences of Botucatu (IBB), Botucatu – at the São Paulo State University “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), we present the manuscript entitled “Temporal and Region-specific Dynamics of Matrix Metalloproteinases Modulation in a Mouse Model of Lipopolysaccharide-induced Epididymitis”, which will be submitted to the journal *Biology of Reproduction*.

The Master's student developed the research project, whose main objective was to investigate whether inflammation induced by lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* modulates the response (mRNA and protein) of matrix metalloproteinases (*Mmp2*, *Mmp7*, *Mmp9*, *Mmp13*) and their tissue inhibitors (*Timp1*, *Timp2*, *Timp3*, *Timp4*, *Reck*), as well as the activity of the gelatinases (MMP2 and MMP9) in the mouse epididymis. Furthermore, the study aimed to examine whether doxycycline, a bacteriostatic antibiotic with broad-spectrum MMP inhibitory activity, widely used for the treatment of bacterial infections of the male reproductive tract, could modulate the inflammatory response and metalloproteinase activity in the epididymis. Below, we present an introduction and the scientific relevance of the project.

Male factors contribute to a significant portion of infertility cases (50-70%), highlighting the relevance of research on male reproductive health (1,2). Historically, however, even with the advent of assisted reproductive technologies (ART), the burden of treating unexplained infertility still has largely fallen on women (3). This long-standing oversight meant paternal factors were not considered as relevant as maternal ones, perpetuating inequalities like the neglect of male health in long-term studies (4). Nevertheless, recent research now underscores the urgent need to prioritize male reproductive health in preconception care and infertility investigations (5–7).

Epidemiological studies have revealed that a significant portion of infertile men suffer from acute or chronic inflammatory conditions in the urogenital system, such as orchitis, prostatitis, urethritis, cystitis (inflammation of the testicles, prostate, urethra and bladder, respectively), and sexually transmitted infections (STIs, e.g., gonorrhea and chlamydia) (8–10). In this context, epididymitis, or inflammation of the epididymis, emerges as one of the

- epididymis. *Biol Reprod.* 2014;90(5):90, 1–10. doi:[10.1095/biolreprod.113.116681](https://doi.org/10.1095/biolreprod.113.116681)
8. Voisin A, Whitfield M, Damon-Soubeyrand C, et al. Comprehensive overview of murine epididymal mononuclear phagocytes and lymphocytes: unexpected populations arise. *J Reprod Immunol.* 2018;126:11–17. doi:[10.1016/j.jri.2018.01.003](https://doi.org/10.1016/j.jri.2018.01.003)
 9. Mendelsohn AC, Sanmarco LM, Spallanzani RG, et al. 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.* 2020;319(6):C997–C1010. doi:[10.1152/ajpcell.00392.2020](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00392.2020)
 10. Barrachina F, Ottino K, Tu LJ, et al. CX3CR1 deficiency leads to impairment of immune surveillance in the epididymis. *Cell Mol Life Sci.* 2022;80(1):15. doi:[10.1007/s00018-022-04664-w](https://doi.org/10.1007/s00018-022-04664-w)
 11. Michel V, Duan Y, Stoschek E, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* causes fibrotic remodelling of the epididymis. *J Pathol.* 2016;240(1):15–24. doi:[10.1002/path.4748](https://doi.org/10.1002/path.4748)
 12. Klein B, Bhushan S, Günther S, et al. Differential tissue-specific damage caused by bacterial epididymo-orchitis in the mouse. *Mol Hum Reprod.* 2020;26(4):215–227. doi:[10.1093/molehr/gaaa011](https://doi.org/10.1093/molehr/gaaa011)
 13. Rusz A, Pilatz A, Wagenlehner F, et al. Influence of urogenital infections and inflammation on semen quality and male fertility. *World J Urol.* 2012;30(1):23–30. doi:[10.1007/s00345-011-0726-8](https://doi.org/10.1007/s00345-011-0726-8)
 14. Schuppe HC, Pilatz A, Hossain H, Diemer T, Wagenlehner F, Weidner W. Urogenital infection as a risk factor for male infertility. *Dtsch Arztebl Int.* 2017;114(19):339–346. doi:[10.3238/arztebl.2017.0339](https://doi.org/10.3238/arztebl.2017.0339)
 15. Silva EJR, Ribeiro CM, Mirim AFM, et al. Lipopolysaccharide and lipoteichoic acid differentially modulate epididymal cytokine and chemokine profiles and sperm parameters in experimental acute epididymitis. *Sci Rep.* 2018;8(1):103. doi:[10.1038/s41598-017-17944-4](https://doi.org/10.1038/s41598-017-17944-4)
 16. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 2008;42(2):145–151. doi:[10.1016/j.cyto.2008.01.006](https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006)
 17. Qian C, Cao X. Regulation of toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1283(1):67–74. doi:[10.1111/j.1749-6632.2012.06786.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06786.x)
 18. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol.* 2015;109(1):14.12.1–14.12.10. doi:[10.1002/0471142735.im1412s109](https://doi.org/10.1002/0471142735.im1412s109)
 19. Cheng L, Wu H, Shi L, et al. Toll-like receptors 4 and 5 cooperatively initiate the innate immune responses to uropathogenic *Escherichia coli* infection in mouse epididymal epithelial cells. *Biol Reprod.* 2016;94(3):58. doi:[10.1095/biolreprod.115.136580](https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.136580)
 20. Fujioka S, Niu J, Schmidt C, et al. NF- κ B and AP-1 connection: mechanism of NF- κ B-dependent regulation of AP-1 activity. *Mol Cell Biol.* 2004;24(17):7806–7819. doi:[10.1128/MCB.24.17.7806-7819.2004](https://doi.org/10.1128/MCB.24.17.7806-7819.2004)
 21. Ferreira LGA, Nishino FA, Fernandes SG, Ribeiro CM, Hinton BT, Avellar MCW. Epididymal embryonic development harbors TLR4/NF κ B signaling pathway as a morphogenetic player. *J Reprod Immunol.* 2022;149:103456. doi:[10.1016/j.jri.2021.103456](https://doi.org/10.1016/j.jri.2021.103456)
 22. Welch RA, Burland V, Plunkett G, et al. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci.* 2002;99(26):17020–17024. doi:[10.1073/pnas.252529799](https://doi.org/10.1073/pnas.252529799)
 23. Pleuger C, Ai D, Hoppe ML, et al. The regional distribution of resident immune cells shapes distinct immunological environments along the murine epididymis. *eLife.* 2022;11:e82193. doi:[10.7554/eLife.82193](https://doi.org/10.7554/eLife.82193)
 24. Andrade AD, Almeida PGC, Mariani NAP, et al. Lipopolysaccharide-induced epididymitis modifies the transcriptional profile of Wfdc genes in mice. *Biol Reprod.* 2021;104(1):144–158. doi:[10.1093/biolre/iaaa189](https://doi.org/10.1093/biolre/iaaa189)
 25. Rodrigues A, Queiróz DBC, Silva EJR, Honda L, Avellar MCW, Hall SH. Activation of toll-like receptor 4 (TLR4) by in vivo and in vitro exposure of rat epididymis to lipopolysaccharide from *Escherichia coli*. *Biol Reprod.* 2008;79(6):1135–1147. doi:[10.1095/biolreprod.108.069930](https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.069930)
 26. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, et al. SP600125, an anthracycline inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci.* 2001;98(24):13681–13686. doi:[10.1073/pnas.251194298](https://doi.org/10.1073/pnas.251194298)
 27. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucl Acids Res.* 2001;29(9):e45–e45. doi:[10.1093/nar/29.9.e45](https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45)
 28. Mariani NAP, Camara AC, Silva AAS, et al. Epididymal protease inhibitor (EPPIN) is a protein hub for seminal vesicle-secreted protein SVS2 binding in mouse spermatozoa. *Mol Cell Endocrinol.* 2020;506:110754. doi:[10.1016/j.mce.2020.110754](https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110754)
 29. Klein B, Pant S, Bhushan S, et al. Dexamethasone improves therapeutic outcomes in a preclinical bacterial epididymitis mouse model. *Hum Reprod.* 2019;34(7):1195–1205. doi:[10.1093/humrep/dez073](https://doi.org/10.1093/humrep/dez073)
 30. O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG. The history of toll-like receptors – redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(6):453–460. doi:[10.1038/nri3446](https://doi.org/10.1038/nri3446)
 31. McConaghy JR, Panchal B. Epididymitis: an overview. *Am Fam Physician.* 2016;94(9):723–726.
 32. Pilatz A, Hossain H, Kaiser R, et al. Acute epididymitis revisited: impact of molecular diagnostics on etiology and contemporary guideline recommendations. *Eur Urol.* 2015;68(3):428–435. doi:[10.1016/j.eururo.2014.12.005](https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.12.005)
 33. Turner TT. De graaf's thread: the human epididymis. *J Androl.* 2008;29(3):237–250. doi:[10.2164/jandrol.107.004119](https://doi.org/10.2164/jandrol.107.004119)
 34. Browne JA, Leir SH, Eggner SE, Harris A. Region-specific innate antiviral responses of the human epididymis. *Mol Cell Endocrinol.* 2018;473:72–78. doi:[10.1016/j.mce.2018.01.004](https://doi.org/10.1016/j.mce.2018.01.004)
 35. El-Zayat SR, Sibai H, Mannaa FA. Toll-like receptors activation, signaling, and targeting: an overview. *Bull Natl Res Cent.* 2019;43(1):187. doi:[10.1186/s42269-019-0227-2](https://doi.org/10.1186/s42269-019-0227-2)
 36. Fijak M, Bhushan S, Michel V, et al. Infectious, inflammatory and 'autoimmune' male factor infertility: how do rodent models inform clinical practice? *Hum Reprod Update.* 2018;24(4):416–441. doi:[10.1093/humupd/dmy009](https://doi.org/10.1093/humupd/dmy009)
 37. Fitzgerald KA, Kagan JC. Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell.* 2020;180(6):1044–1066. doi:[10.1016/j.cell.2020.02.041](https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.041)
 38. Gong J, Wang P, Liu JC, et al. Integrative analysis of small RNA and mRNA expression profiles identifies signatures associated with chronic epididymitis. *Front Immunol.* 2022;13:883803. doi:[10.3389/fimmu.2022.883803](https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.883803)
 39. Bhushan S, Tchatalbachev S, Klug J, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* block MyD88-dependent and activate MyD88-independent signaling pathways in rat testicular cells. *J Immunol.* 2008;180(8):5537–5547. doi:[10.4049/jimmunol.180.8.5537](https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.8.5537)
 40. Hunstad David A, Justice Sheryl S, Hung Chia S, Lauer Scott R, Hultgren Scott J. Suppression of bladder epithelial cytokine responses by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 2005;73(7):3999–4006. doi:[10.1128/iai.73.7.3999-4006.2005](https://doi.org/10.1128/iai.73.7.3999-4006.2005)
 41. Anders HJ, Patole PS. Toll-like receptors recognize uropathogenic *Escherichia coli* and trigger inflammation in the urinary tract. *Nephrol Dial Transplant.* 2005;20(8):1529–1532. doi:[10.1093/ndt/gfh922](https://doi.org/10.1093/ndt/gfh922)
 42. Demirel I, Persson A, Brauner A, Särndahl E, Kruse R, Persson K. Activation of NLRP3 by uropathogenic *Escherichia coli* is associated with IL-1 β release and regulation of antimicrobial properties in human neutrophils. *Sci Rep.* 2020;10(1):21837. doi:[10.1038/s41598-020-78651-1](https://doi.org/10.1038/s41598-020-78651-1)
 43. Lu Y, Rafiq A, Zhang Z, et al. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence factor hemolysin A causes programmed cell necrosis by altering mitochondrial dynamics. *FASEB J.* 2018;32(8):4107–4120. doi:[10.1096/fj.201700768R](https://doi.org/10.1096/fj.201700768R)
 44. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(3):179–190. doi:[10.1038/nri2038](https://doi.org/10.1038/nri2038)

45. Hedger MP. Immunophysiology and pathology of inflammation in the testis and epididymis. *J Androl.* 2011;32(6):625-640. doi:[10.2164/jandrol.111.012989](https://doi.org/10.2164/jandrol.111.012989)
46. Palladino MA, Savarese MA, Chapman JL, Dughi MK, Plaska D. Localization of toll-like receptors on epididymal epithelial cells and spermatozoa. *Am J Reprod Immunol.* 2008;60(6):541-555. doi:[10.1111/j.1600-0897.2008.00654.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-0897.2008.00654.x)
47. Zhao YT, Guo JH, Wu ZL, Xiong Y, Zhou WL. Innate immune responses of epididymal epithelial cells to *Staphylococcus aureus* infection. *Immunol Lett.* 2008;119(1):84-90. doi:[10.1016/j.imlet.2008.05.002](https://doi.org/10.1016/j.imlet.2008.05.002)
48. Liu JC, Wang P, Zeng QX, et al. Myd88 signaling is involved in the inflammatory response in LPS-induced mouse epididymitis and bone marrow-derived dendritic cells. *Int J Mol Sci.* 2023;24(9):7838. doi:[10.3390/ijms24097838](https://doi.org/10.3390/ijms24097838)
49. Song X, Lin NH, Wang YL, Chen B, Wang HX, Hu K. Comprehensive transcriptome analysis based on RNA sequencing identifies critical genes for lipopolysaccharide-induced epididymitis in a rat model. *Asian J Androl.* 2019;21(6):605-611. doi:[10.4103/aja.aja_21_19](https://doi.org/10.4103/aja.aja_21_19)
50. Hirai S, Naito M, Terayama H, et al. Difference in abundance of blood and lymphatic capillaries in the murine epididymis. *Med Mol Morphol.* 2010;43(1):37-42. doi:[10.1007/s00795-009-0473-8](https://doi.org/10.1007/s00795-009-0473-8)
51. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008;454(7203):428-435. doi:[10.1038/nature07201](https://doi.org/10.1038/nature07201)
52. Zhu W, Zhao S, Liu Z, et al. Pattern recognition receptor-initiated innate antiviral responses in mouse epididymal epithelial cells. *J Immunol.* 2015;194(10):4825. doi:[10.4049/jimmunol.1402706](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1402706)
53. Meng Q, Xia Y. c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein Cell.* 2011;2(11):889-898. doi:[10.1007/s13238-011-1113-3](https://doi.org/10.1007/s13238-011-1113-3)
54. Waudby CA, Alvarez-Teijeiro S, Josue Ruiz E, et al. An intrinsic temporal order of c-JUN N-terminal phosphorylation regulates its activity by orchestrating co-factor recruitment. *Nat Commun.* 2022;13(1):6133. doi:[10.1038/s41467-022-33866-w](https://doi.org/10.1038/s41467-022-33866-w)
55. Pleuger C, Silva EJR, Pilatz A, Bhushan S, Meinhardt A. Differential immune response to infection and acute inflammation along the epididymis. *Front Immunol.* 2020;11:3125. doi:[10.3389/fimmu.2020.599594](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.599594)
56. Wang M, Yang Y, Cansever D, et al. Two populations of self-maintaining monocyte-independent macrophages exist in adult epididymis and testis. *Proc Natl Acad Sci.* 2021;118(1):e2013686117. doi:[10.1073/pnas.2013686117](https://doi.org/10.1073/pnas.2013686117)
57. Battistone MA, Elizagaray ML, Barrachina F, Ottino K, Mendelsohn AC, Breton S. Immunoregulatory mechanisms between epithelial clear cells and mononuclear phagocytes in the epididymis. *Andrology.* 2023;1-15. doi:[10.1111/andr.13509](https://doi.org/10.1111/andr.13509)
58. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2(1):17023. doi:[10.1038/sigtrans.2017.23](https://doi.org/10.1038/sigtrans.2017.23)
59. Khalaf H, Jass J, Olsson PE. Differential cytokine regulation by NF- κ B and AP-1 in Jurkat T-cells. *BMC Immunol.* 2010;11(1):26. doi:[10.1186/1471-2172-11-26](https://doi.org/10.1186/1471-2172-11-26)
60. Viola A, Munari F, Sánchez-Rodríguez R, Scolaro T, Castegna A. The metabolic signature of macrophage responses. *Front Immunol.* 2019;10:1462. doi:[10.3389/fimmu.2019.01462](https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01462)

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Andrade AD, Almeida PGC, Mariani NAP, et al. Regional modulation of toll-like receptor signaling pathway genes in acute epididymitis in mice. *Andrology.* 2024;1-14. <https://doi.org/10.1111/andr.13630>