

Análise do Epidídimo Humano, Colhido *in vivo*, por Microscopia Electrónica de Transmissão

Transmission Electron Microscope Analysis of the in vivo Collected Human Epididymis

Autores:

Joana Vieira Silva¹, António Patrício², Nuno Maia², Vladimiro Silva³, Georg Luers⁴, Alfredo Mota⁵, Odete A. B. da Cruz e Silva⁶, Edgar da Cruz e Silva¹, Margarida Fardilha¹

Instituições:

- ¹ Laboratório de Transdução de Sinais do Centro de Biologia Celular e Secção Autónoma de Ciências da Saúde da Universidade de Aveiro;
² Serviço de Urologia do Hospital Infante D. Pedro em Aveiro;
³ Ferticentro do Centro de Estudos de Fertilidade em Coimbra;
⁴ Institute for Anatomy and Cell Biology da Justus Liebig-University em Giessen, Alemanha;
⁵ Serviço de Urologia e Transplantação Renal dos Hospitais da Universidade de Coimbra;
⁶ Laboratório de Neurociências do Centro de Biologia Celular e Secção Autónoma de Ciências da Saúde Universidade de Aveiro.

Correspondência:

Margarida Fardilha
 Departamento de Biologia do Centro de Biologia Celular,
 Universidade de Aveiro 3810-193 Aveiro, Portugal
 Tel: +351-234370213; Fax: +351-234401597; e-mail: mfardilha@ua.pt

Data de Submissão: 8 de Junho de 2011 | Data de Aceitação: 12 de Agosto de 2011

Resumo

Objectivos: A compreensão dos mecanismos celulares e moleculares subjacentes à maturação dos espermatozoides no epidídimo é o primeiro passo na identificação de novos alvos para intervenção terapêutica na infertilidade ou contraceção masculina. Para tal, neste trabalho, procedemos à caracterização da ultra-estrutura do epidídimo humano por microscopia electrónica de transmissão.

Material e Métodos: Amostras de epidídimo humano foram colhidas *in vivo*, no âmbito de colheita de órgãos para transplantação, em colaboração com o Serviço de Urologia e Transplantação Renal dos Hospitais da Universidade de Coimbra, processadas no Laboratório de Transdução de Sinais do Centro de Biologia Celular da Universidade de Aveiro e analisadas por microscopia electrónica de transmissão no Instituto de Anatomia e Biologia Celular, Universidade *Justus Liebig*, Alemanha.

Resultados: Após observação do epitélio da região proximal do epidídimo por microscopia electrónica de transmissão, verificou-se que este é revestido por dois tipos de células: ciliadas e principais. As células ciliadas auxiliam no movimento dos espermatozoides ao longo do epidídimo. As células principais exibem características morfológicas de células activamente envolvidas na absorção e secreção.

Foi, ainda, possível observar a formação de protuberâncias apicais, que quando desatadas libertam o seu conteúdo - epididimossomas, que revelam, de forma evidente, a existência de um mecanismo pouco convencional de secreção de proteínas no epidídimo humano, a secreção apócrina.

Conclusões: Os resultados obtidos fornecem, pela primeira vez, informações acerca da histologia e funcionalidade do epidídimo humano colhido *in vivo*. Representam o primeiro passo para a compreensão da fisiologia deste órgão e para a identificação de alvos para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas na infertilidade masculina ou desenvolvimento de contraceptivos com acção pós-testicular.

Palavras-chave: Epidídimo; microscopia electrónica de transmissão; secreção apócrina; infertilidade masculina; contraceção masculina.

Abstract

Aims: *The comprehension of the cellular and molecular mechanisms underlying the maturation of sperm in the epididymis is the first step in the identification of new targets for therapeutic intervention in male infertility or contraception. Henceforth, in this work, we characterized the ultrastructure of the human epididymis by transmission electronic microscopy.*

Materials and Methods: Human epididymis samples were collected, *in vivo*, during procedures to collect organs for transplantation, in collaboration with the Urology and Renal Transplant Service in the Hospitais da Universidade de Coimbra. The samples were then processed in the Laboratory of Signal Transduction of the Center for Cellular Biology of the University of Aveiro and analyzed by transmission electronic microscopy in the Institute of Anatomy and Cellular Biology of the University of Justus Liebig in Germany.

Results: After observation of the epithelium of the proximal region of the epididymis by transmission electronic microscopy, two types of cells were found: ciliated and non-ciliated/principal. The ciliated cells help the movement of sperm along the epididymis. The principal cells exhibit morphological characteristics of cells involved in absorption and secretion. In addition, of apical blebs, that detach from the principal cell and then breakdown to liberate their content – epididymosomes was observed, clearly revealing the existence of an unconventional protein secretion mechanism in the human epididymis, the apocrine secretion.

Conclusions: The obtained results provide, for the first time, information on the histology and functionality of the human epididymis when collected *in vivo*. They represent the first step towards the comprehension of this organ's physiology and target identification for the development of therapeutic interventions in male infertility and/or contraceptives with post-testicular action.

Key-words: Epididymis, transmission electron microscopy, apocrine secretion, male infertility, male contraception.

Introdução

O sucesso actual dos métodos de reprodução medicamente assistida, nos quais se utilizam espermatozoides obtidos directamente do testículo, ultrapassando os processos que ocorrem no epidídimo, refinados por milhões de anos de evolução, sugere, erradamente, que o epidídimo humano não é necessário para o desenvolvimento da capacidade de fertilização dos espermatozoides¹. O epidídimo é um tubo longo enrolado sobre si próprio que serve de conduto ao transporte de espermatozoides dos testículos para os canais deferentes. É nele que os espermatozoides amadurecem e adquirem as suas funções de motilidade progressiva e capacidade de fecundação. Nos humanos são necessários, aproximadamente, 7 a 10 dias para os espermatozoides

atingirem a cauda do epidídimo, onde são armazenados². No entanto, este período de tempo está relacionado com a quantidade de espermatozoides a serem transportados, que depende, por exemplo, da produção diária de espermatozoides^{3,4}. A maturação epididimal dos gâmetas masculinos envolve várias modificações: (1) remodelação da membrana citoplasmática, (2) alterações na composição e localização intra-celular de proteínas, (3) alteração do conteúdo glicoproteico e (4) alterações de pH, níveis de Ca²⁺ e cAMP^{5,6,7}. A maturação dos espermatozoides envolve a interacção com proteínas sintetizadas e segregadas em regiões específicas do epitélio do epidídimo. Todos os modelos de infertilidade masculina relacionada com o epidídimo em ratinhos transgénicos, enfatizam a importância da região proximal do epidídimo⁸. Contudo, o epidídimo humano difere constitucionalmente do seu homólogo na maioria das outras espécies de mamíferos, por exemplo, devido ao facto de não apresentar divisões claras entre as diferentes partes que o constituem (*caput, corpus e cauda*)⁹. De acordo com vários estudos de perfil genético, de RNA mensageiro e localização de proteínas é possível que as diferenças mais significativas na actividade secretória deste órgão sejam desempenhadas pela região mais proximal^{10,11,12}.

Infelizmente, pouco se sabe acerca do epidídimo humano e do seu papel na maturação dos espermatozoides devido, essencialmente, à escassez de tecido humano normal colhido *in vivo* de indivíduos saudáveis, em idade reprodutiva. O papel do microambiente luminal do epidídimo e os mecanismos que este utiliza para realizar as suas funções permanecem desconhecidos. A maioria dos avanços no conhecimento sobre biologia e função do epidídimo resultaram do estudo de modelos animais ou em humanos, no contexto de vasectomia, orquidectomia por tumor testicular, ou *post mortem*¹³. Contudo, existe variação estrutural de segmentos do epidídimo entre espécies, sugerindo alguma diferença na maturação pós-testicular. Adicionalmente, durante a maturação, os espermatozoides perdem a maior parte das proteínas testiculares de superfície e adquirem novas, sendo este padrão de modificação específico para cada espécie¹⁴.

A importância de compreender o processo de maturação epididimal é enfatizada pelo facto de 40% dos homens inférteis exibirem infertilidade idiopática, o que talvez reflecta transtornos na maturação espermática¹⁵. Outro aspecto importante é o potencial para identificar possíveis mecanismos como alvos para contraceptivos não-esteróides. Deste modo, o primeiro passo para compreender os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na maturação dos espermatozoides no epidídimo

humano é caracterizar o ducto epididimal. Assim, no presente trabalho, a ultra-estrutura do epitélio da região proximal do epidídimo foi caracterizada utilizando microscopia electrónica de transmissão.

Materiais e Métodos

Colheita de Epidídimo Humano

Integrados na equipa cirúrgica de colheita de órgãos para transplante, em colaboração com o Serviço de Urologia e Transplantação Renal dos Hospitais da Universidade de Coimbra, procedeu-se à obtenção de fragmentos, por biopsia, de diferentes regiões do epidídimo de um dador jovem em idade reprodutiva. A colheita, processamento, armazenamento e preservação dos tecidos de origem humana foram realizados de acordo com os normativos comunitários estabelecidos nas Directivas Comunitárias 2004/23/CE, 2006/17/CE e 2006/86/CE.

Microscopia Electrónica de Transmissão – Análise da Ultra-estrutura do Epidídimo Humano

Fixação e Pós-Fixação

Para a análise por microscopia electrónica, os fragmentos de epidídimo foram imediatamente imersos em fixador (1% para-formaldeído, 0,5% glutaraldeído, 0,025% ácido pícrico, 0,1M tampão cacodilato, pH 7,4) após a colheita. As amostras foram mantidas no fixador durante cerca de 12 horas, para uma correcta fixação. De seguida, foram transferidas para um tampão apropriado (0,1M tampão cacodilato, pH 7,4). Após a fixação, as mesmas foram pós-fixadas com 1% tetróxido de ósmio (fixador secundário), durante 12 horas.

Desidratação e Incorporação

As amostras de epidídimo foram desidratadas utilizando percentagens crescentes de etanol (70%, 80%, 90%, 100%, 3 vezes, 15 minutos cada passo). Após desidratação as amostras foram incubadas

com óxido de propileno (solvente de transição) (3 vezes, 5 minutos) e, em seguida, com uma mistura de óxido propileno e resina monomérica (1:1) durante 30 minutos. As amostras foram, então, transferidas para resina monomérica a 4°C, durante 12 horas. No fim, o tecido foi incorporado em resina (grau médio) e polimerizada a 60°C durante 48 horas.

Seccionamento, Coloração e Observação

Para a selecção de regiões de interesse no microscópio óptico, secções de 1µm foram preparadas e coradas com solução de Rudeberg. Após a selecção de uma região de interesse, foram cortadas secções de 80nm, recolhidas em grelhas de níquel e revestidas com filme Formvar 1%. Por fim, foram contrastadas com acetato de uranilo (2 minutos) e citrato de chumbo (45 segundos) e observadas por microscopia electrónica de transmissão (LEO 906 microscope, Zeiss, Oberkochen, Germany).

Resultados

A análise da ultra-estrutura da região proximal do epidídimo humano foi realizada por microscopia electrónica de transmissão. Na figura 1 observam-se os cílios e microvilosidades projectados da membrana luminal das células ciliadas (figura 1B, vermelho) e principais (figura 1C, verde), ou principais, respectivamente. As células não-ciliadas estendem-se do lúmen para a lâmina basal e têm núcleos redondos ou ovais que ocupam a metade basal da célula. As células ciliadas têm núcleos heterocromáticos ovais alongados que se encontram, maioritariamente, na parte luminal da célula. O epidídimo é a única porção do tracto masculino que possui verdadeiros cílios móveis. Nos dois tipos celulares é possível identificar vários organelos: complexo de Golgi, mitocôndrias e retículo endoplasmático rugoso. As células ciliadas são ricas em mitocôndrias apicais com núcleos localizados mais apicalmente do que nas células não-ciliadas.

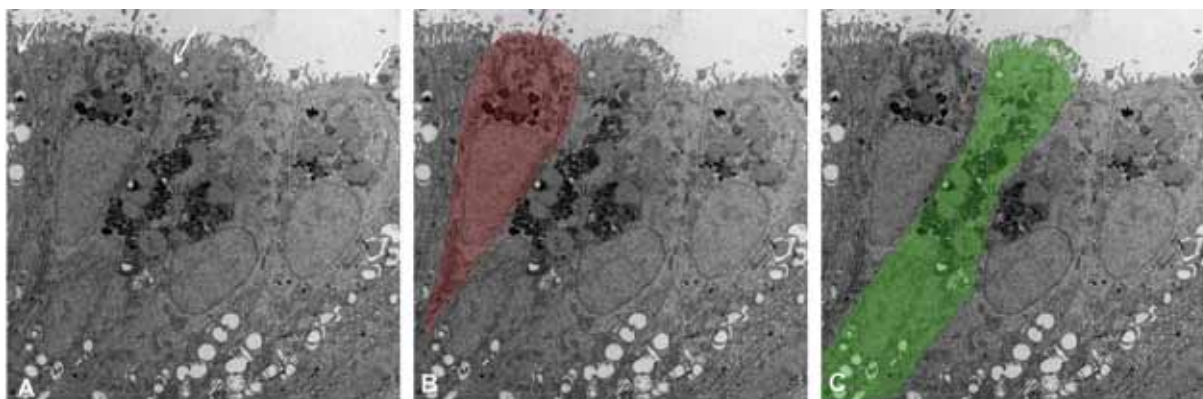


Figura 1) Epitélio dos ductos deferentes do epidídimo humano: células ciliadas (vermelho) e não ciliadas/principais (verde). Em A é possível observar os cílios e microvilosidades projectados da superfície das células ciliadas (salientada a vermelho em B) e não ciliadas/principais (evidenciada a verde em C), respectivamente. Barra representa 2500nm.

Para além disso, as células principais contêm uma plethora de vesículas de densidade variada e vacúolos, o que reflecte a sua actividade secretória. Isto indica que as células principais podem participar na secreção e absorção celular. É também possível observar as junções apertadas (figura 1A, setas) entre a membrana lateral plasmática de duas células adjacentes, que permitem a criação de restrições ao fluxo plasmático entre o compartimento luminal e o plasma sanguíneo (barreira hemato-epididimária).

Na figura 2, podemos observar evidências de actividade secretória nas células principais. Para além das características morfológicas já referidas, podem observar-se na membrana apical a formação de vesículas secretórias, que contêm estruturas membranosas designadas epididimossomas (figura 2, azul).

Discussão

A região proximal do epidídimo é revestida por um epitélio de células colunares ciliadas (figura 1B, vermelho) e não-ciliadas (figura 1C, verde)/principais. Esta estrutura é similar à descrita nos ratos¹⁶, porquinhos da índia¹⁷ e hamsters¹⁸, entre outros. O epitélio polarizado do epidídimo cria um dos ambientes mais complexos encontrados numa glândula exócrina. Uma secreção proteica não-convencional, referida como secreção apócrina, foi proposta para o epidídimo¹⁹. A secreção apócrina, ao contrário da secreção merócrina em que vesículas secretórias se fundem com a membrana apical e os produtos são lançados para o exterior da célula, é caracterizada pela perda da parte apical do citoplasma das células juntamente com o produto de secreção. Proteínas segregadas por esse método partilham várias peculiaridades: (1) a sua biossíntese, assim como, modificações pós-translacionais ocorrem no citoplasma, (2) o transporte intracelular procede sem participação do retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e vesículas secretórias, (3) o transporte dentro da célula secretória é mediado pela albumina, (4) a sequência primária é sintetizada sem péptido sinalizador, (5) o seu N-terminal encontra-se acetilado, (6) algumas possuem âncora de glicosilfosfatidilinositol (GPI) e (7) a sua libertação no lúmen implica a formação de protruções apicais ou epididimossomas, observados na figura 2 (azul). Aqui demonstrámos que, à semelhança de outras espécies^{20, 21, 22}, este mecanismo não-convencional de secreção de proteínas também ocorre no epidídimo humano, mais especificamente nas células principais que evidenciam características morfológicas de células envolvidas na secreção de proteínas. A caracterização e funções dos epididimossomas permanecem largamente desconhecidas e estas descobertas abrem novos caminhos para a

compreensão da fisiologia do epidídimo humano (figura 3). Algumas das questões prendem-se com o transporte intracelular das proteínas, a coordenação entre a secreção merócrina (exocitose) e a secreção apócrina e, finalmente, os mecanismos de reparação da membrana apical da célula após a libertação dos epididimossomas. A maturação dos espermatozóides inclui a aquisição de motilidade, na qual o padrão de movimento varia de vibração ligeira a progressão rápida, alterações no tamanho, forma e estrutura interna do acrossoma²³. Durante o processo de maturação, os gâmetas masculinos ganham ainda novas proteínas e modificam a maior parte das suas proteínas testiculares de superfície. Foi já demonstrado que os factores envolvidos na interacção espermatozóide-zona pelúcida e na fusão espermatozóide-ócito são adquiridos no epidídimo¹². Como demonstrado anteriormente, o epitélio epididimal tem elevada síntese proteica e actividade secretória, sendo a maior parte das proteínas presentes no fluido epididimal hidrofóbicas. Estas raramente estão presentes na forma solúvel no fluido epididimal, estando parcialmente associadas com estruturas membranares, os epididimossomas – secreção apócrina^{24,25} (figura 3).

Conclusões

Com este trabalho mostramos evidências da actividade secretória do epidídimo humano, colhido *in vivo*. No entanto, os mecanismos pelos quais o epitélio epididimal humano secreta epididimossomas e pelos quais as proteínas são transferidas para os espermatozóides são ainda desconhecidos. Além disso, apenas cerca de 10% das proteínas totais presentes no fluido epididimal foram identificadas e não se conhecem os papéis específicos da maioria das proteínas já identificadas¹⁴, sendo imperativa a continuidade do estudo deste órgão.

Actuar directamente nos espermatozóides presentes no epidídimo, mais especificamente em componentes das cascatas de sinalização dos espermatozóides, representará uma eventual excelente intervenção terapêutica, no âmbito da infertilidade masculina. Por exemplo, interferindo com interacções proteína-proteína é possível modular funções específicas como a capacitação e mobilidade dos espermatozóides^{26,27}. Não se encontram ainda disponíveis contraceptivos masculinos modernos e não-invasivos. O epidídimo apresenta-se como um potencial alvo, sendo um possível exemplo de actuação interferir com os mecanismos de secreção do epidídimo (secreção apócrina) de forma a modificar a composição do fluido do lúmen do epidídimo, reduzindo a concentração das proteínas necessárias à maturação dos espermatozóides. É importante ter em consideração que possíveis moduladores da função do epidídimo

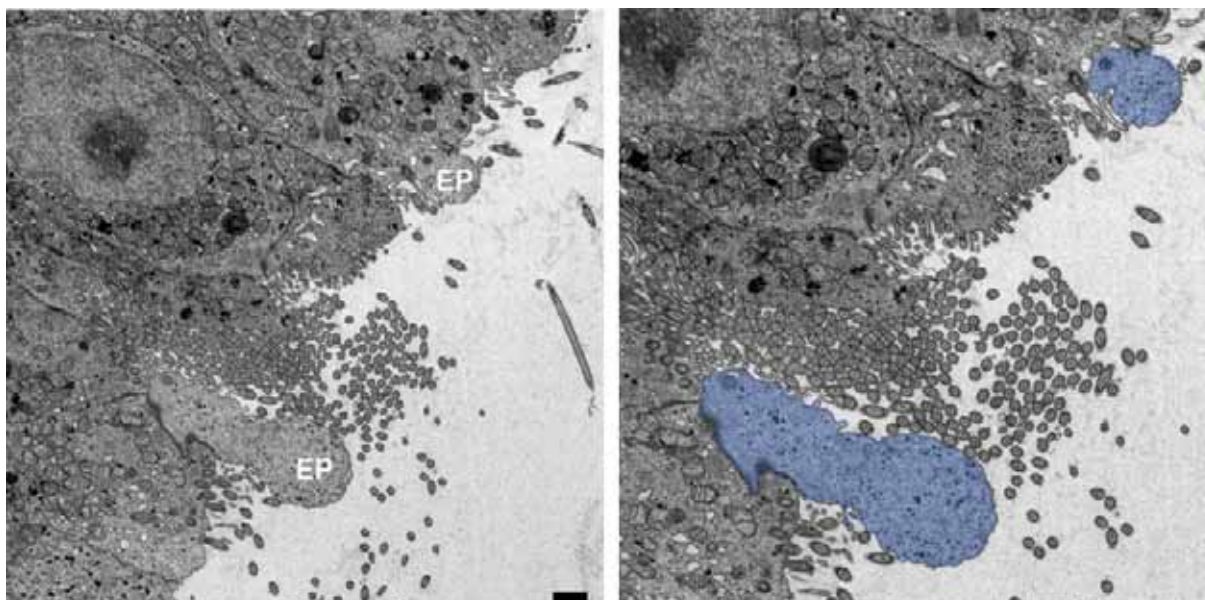


Figura 2) Secreção apócrina nas células não ciliadas do epidídimo humano colhido *in vivo*. Em A é possível observar a formação de protusões apicais que contêm estruturas membranosas designadas epididimossomas (EP) pelas células epididimais não ciliadas (processo destacado a azul em B). Barra representa 1000nm.

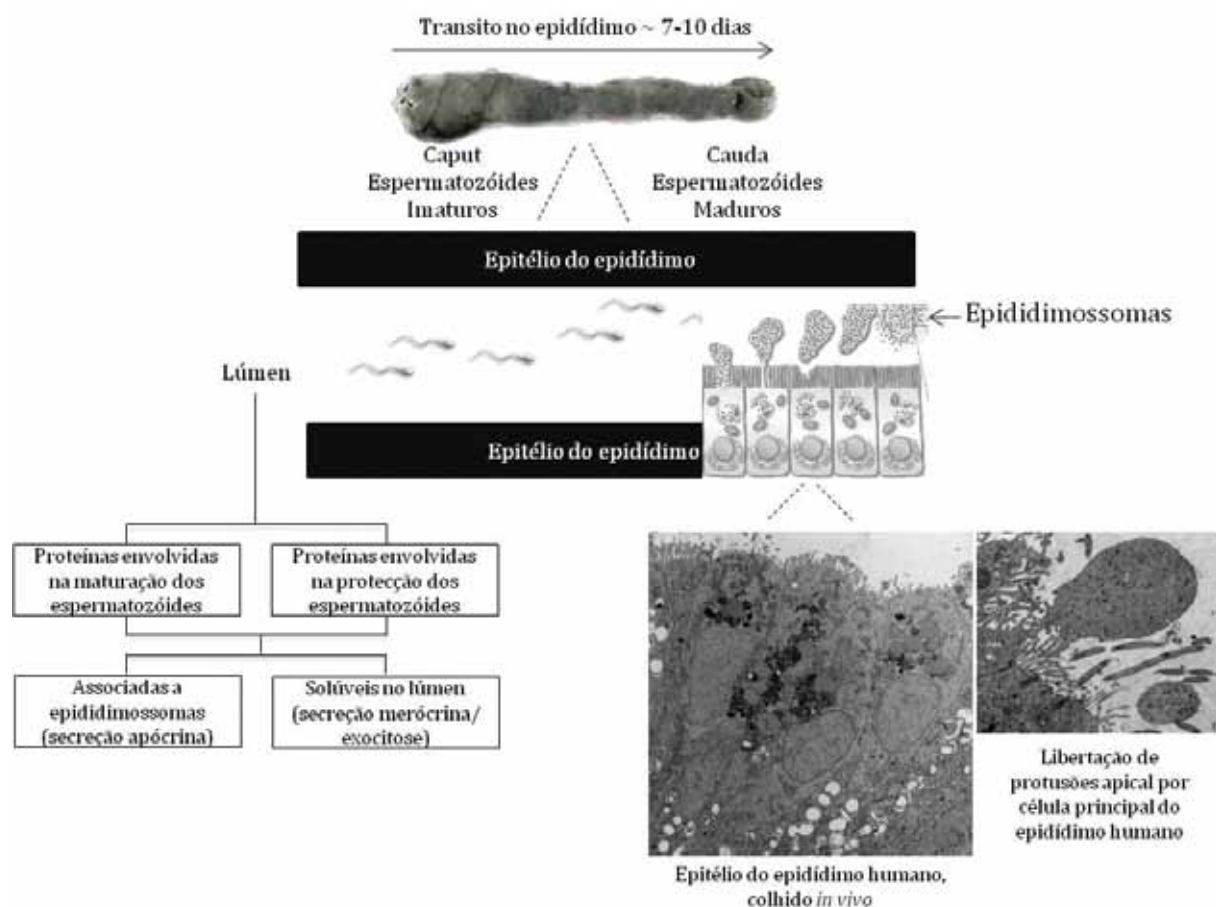


Figura 3) Representação esquemática do papel do epidídimo na maturação dos espermatozóides. O epidídimo é normalmente dividido em 3 segmentos: caput (cabeça), corpus (corpo) e cauda. Nos humanos, a divisão entre estes segmentos não é muito clara, sendo que o caput é maioritariamente formado por túbulos eferentes e a cauda não é tão proeminente como observado em outros mamíferos. O epidídimo desempenha diversas funções: reabsorção de fluido proveniente dos túbulos seminíferos, transporte dos gâmetas masculinos, eliminação de gâmetas anormais e maturação, protecção e armazenamento de espermatozóides²⁸. No lúmen epididimal, os gâmetas masculinos interagem com vesículas designadas epididimossomas, cuja composição proteica varia ao longo do ducto e difere das proteínas solúveis que são secretadas para o lúmen por exocitose. A transferência de proteínas dos epididimossomas para os espermatozóides depende da temperatura, pH e é mais eficiente na presença de zinco²⁹. Os epididimossomas têm um papel fundamental na aquisição de novas proteínas pelos gâmetas masculinos em maturação.

devem ser capazes de atravessar, ou ser transportados, através da barreira hemato-epididimária. Existem diversas vantagens em interferir com a função do epidídimo, como este tipo de intervenção não ter qualquer impacto na espermatogénese ou função testicular. Para além disso, o eixo hipotálamo-hipófise-gónada não é afectado. Por fim, tanto o início como a reversibilidade do efeito contraceptivo serão curtos, visto o transporte pelo epidídimo ser um evento rápido (7-10 dias).

O estudo da ultra-estrutura do epidídimo humano colhido *in vivo* representa, assim, o primeiro passo para a compreensão da fisiologia deste órgão e para a identificação de alvos para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas na infertilidade masculina ou desenvolvimento de contraceptivos com acção pós-testicular.

Agradecimentos

Agradecemos a participação do Doutor Miguel Conde na edição das figuras 1 e 2.

Conflitos de Interesse

Todos os autores declaram que participaram no corrente trabalho e se responsabilizam por ele. Declaram, ainda, que não existem, da parte de qualquer um deles, conflitos de interesse nas afirmações proferidas no presente artigo.

Bibliografia

- Roberts KP. The Epididymis: From Molecules to Clinical Practice: A Comprehensive Survey of the Efferent Ducts, the Epididymis and Vas Deferens: edited by Bernard Robaire and Barry T. Hinton, 575 pp., with author and subject indices, New York, NY: Kluwer Academic and Plenum Publishers. ISBN 0-306-46684-8. *J Androl* 2002;23(5):620.
- Rowley MJ, Teshima F, Heller CG. Duration of transit of spermatozoa through the human male ductular system. *Fertil Steril* 1970;21(5):390-6.
- Johnson TE, Hartman PS. Radiation effects on life span in *Caenorhabditis elegans*. *J Gerontol* 1988;43:B137-B141.
- Jongé CJD, Barrat CLR. The Sperm Cell - Production, Maturation, Fertilization, Regeneration. Cambridge University Press 2006.
- Vijayaraghavan S, Hoskins DD. Regulation of bovine sperm motility and cyclic adenosine 3',5' -monophosphate by adenosine and its analogues. *Biol Reprod* 1986;34(3):468-77.
- Huang Z, Vijayaraghavan S. Increased Phosphorylation of a Distinct Subcellular Pool of Protein Phosphatase, PP1 γ 2, During Epididymal Sperm Maturation. *Biol Reprod* 2004;70(2):439-47.
- Vijayaraghavan S, Stephens DT, Trautman K, et al. Sperm motility development in the epididymis is associated with decreased glycogen synthase kinase-3 and protein phosphatase 1 activity. *Biol Reprod* 1996;54(3):709-18.
- Hinton BT, Cooper TG. The Epididymis as a Target for Male Contraceptive Development. *Fertility Control. U.-F. Habenicht and R. J. Aitken, Springer Berlin Heidelberg* 2010;198:117-37.
- Yeung CH, Cooper TG, Bergmann M, Schulze H. Organization of tubules in the human caput epididymidis and the ultrastructure of their epithelia. *Am J Anat* 1991;191(3):261-79.
- Zhang JS, Liu Q, Li YM, Hall SH, French FS, Zhang YL. Genome-wide profiling of segmental-regulated transcriptomes in human epididymis using oligo microarray. *Mol Cell Endocrinol* 2006;250(1-2):169-77.
- Dubé E, Chan PT, Hermo L, Cyr DG. Gene expression profiling and its relevance to the blood-epididymal barrier in the human epididymis. *Biol Reprod* 2007;76(6):1034-44.
- Thimon V, Koukoui O, Calvo E, Sullivan R. Region-specific gene expression profiling along the human epididymis. *Mol Hum Reprod* 2007;13(10):691-704.
- Rajalakshmi M, Kumar BV, Kapur MM, Pal PC. Ultrastructural changes in the efferent duct and epididymis of men with obstructive infertility. *Anat Rec* 1993;237(2):199-207.
- Dacheux JL, Belleannée C, Jones R, et al. Mammalian epididymal proteome. *Mol Cell Endocrinol* 2009;306(1-2):45-50.
- Cornwall GA. New insights into epididymal biology and function. *Hum Reprod Update* 2009;15(2):213-27.
- Hoffer AP. The fine structure of the ductuli efferentes in mouse and rat. *Anat Rec* 1972;172:331-2.
- Hoffer AP, Greenberg J. The structure of the epididymis, efferent ductules and ductus deferens of the guinea pig: a light microscope study. *Anat Rec* 1978;190:659-78.
- Flickinger CJ, Howards SS, English HF. Ultrastructural differences in efferent ducts and several regions of the epididymis of the hamster. *Am J Anat* 1978;152:557-86.
- Aumüller G, Wilhelm B, Seitz J. Apocrine secretion-fact or artifact? *Ann Anat* 1999;181(5):437-46.
- Dacheux JL, Castella S, Gatti JL, Dacheux F. Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 2005;63(2):319-41.
- Bajpai VK, Shipstone AC, Ratna Kumar BV, Qaisar J, Setty BS. Ultrastructure of the epididymal epithelium of rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Acta Eur Fertil* 1985;16(3):207-17.

- ²². Agrawal Y, Vanha-Perttula T. Electron microscopic study of the secretion process in bovine reproductive organs. *J Androl* 1988;9(5):307-16.
- ²³. Olson GE, NagDas SK, et al. Structural differentiation of spermatozoa during post-testicular maturation. In *The Epididymis: from Molecules To Clinical Practice*. New York, Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2002.
- ²⁴. Frenette G, Lessard C, Sullivan R. Selected proteins of “prostasome-like particles” from epididymal cauda fluid are transferred to epididymal caput spermatozoa in bull. *Biol Reprod* 2002;67(1):308-13.
- ²⁵. Gatti JL, Métayer S, Belghazi M, Dacheux F, Dacheux JL. Identification, proteomic profiling, and origin of ram epididymal fluid exosome-like vesicles. *Biol Reprod* 2005;72(6):1452-65.
- ²⁶. Fardilha M, Esteves SL, Korrodi-Gregório L, Pelech S, da Cruz E Silva OA, da Cruz E Silva E. Protein phosphatase 1 complexes modulate sperm motility and present novel targets for male infertility. *Mol Hum Reprod* 2011;17(8):466-77.
- ²⁷. Fardilha M, Esteves SLC, Korrodi-Gregório L, da Cruz e Silva OA, da Cruz e Silva FF. The Physiological Relevance of Protein Phosphatase 1 and its Interacting Proteins to Health and Disease. *Curr Med Chem* 2010;17:3:3996-4017.
- ²⁸. Cooper TG. The human epididymis-is it necessary? *Int J Androl* 1993;16(4):245-50.
- ²⁹. Sullivan R, Frenette G, Girourard J. Epididymosomes are involved in the acquisition of new sperm proteins during epididymal transit. *Asian J Androl* 2007;9(4):483-91.