



Sollirium
ENSINO E PESQUISA

ANDROMONDAY

FOSFOLIPASE CZ

Fator masculino e suas
implicações na ICSI.

Tiago Magalhães

Fellow Andrologia

ATIVACÃO DO OÓCITO

Série de eventos que acontecem durante a fertilização pelo espermatozoide.



ATIVACÃO DO OÓCITO

Série de eventos que acontecem durante a fertilização pelo espermatozoide.

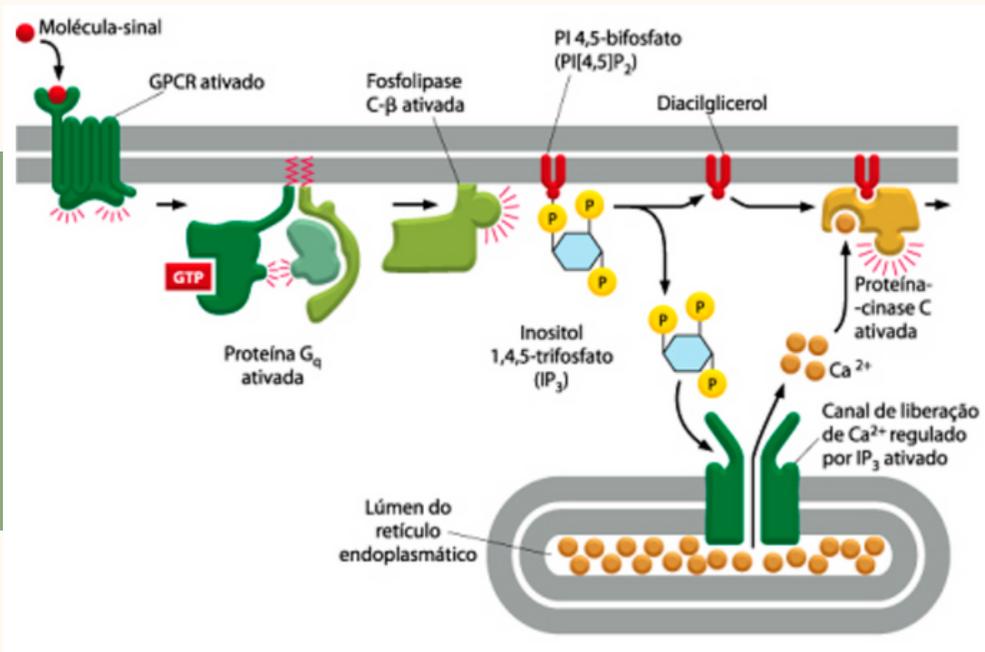
REINÍCIO DA MEIOSE

BLOQUEIO DA
POLISPERMIA

ATIVACÃO DO
METABOLISMO

SÍNTESE DE DNA

TRADUÇÃO DE RNAM



FOSFOLIPASE CZ

Cliva diretamente o fosfoinositol 4,5-bisfosfato (PI[4,5]P₂) para produzir INOSITOL 1,4,5-TRIFOSFATO e diacilglicerol.

INOSITOL 1,4,5-TRIFOSFATO (IP₃)

Aumento na concentração de IP₃ > Liberação de Ca²⁺ do retículo endoplasmático.

FLUXO DE CÁLCIO

Elevação de Ca²⁺ > Abertura de mais canais de Ca²⁺ > Onda e Oscilações de Ca²⁺ intracitoplasmático.

ATIVACÃO DO OÓCITO

PRONÚCLEO FEMININO

Término da meiose > 01 oócito maduro e 01 segundo corpo polar.

Cromossomos maternos se descondensam.

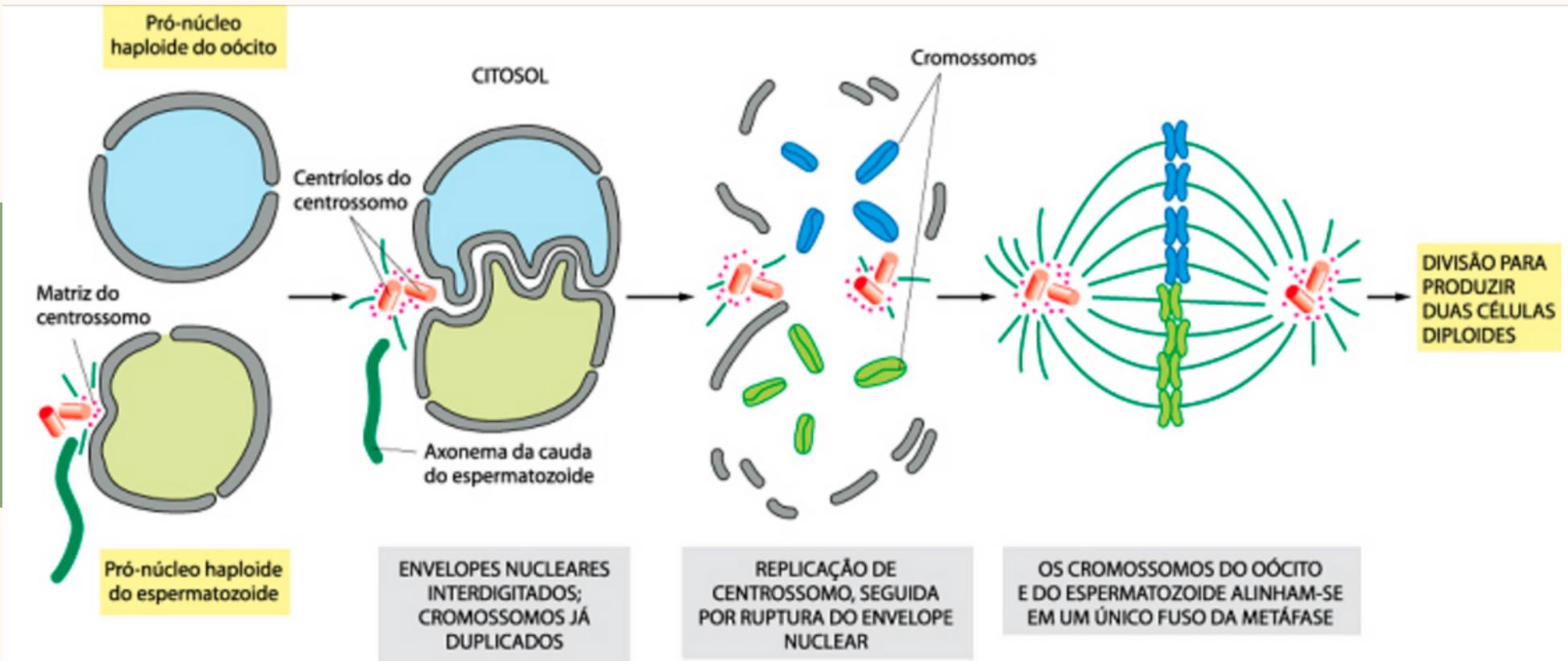
Núcleo do ooócito maduro torna-se o pronúcleo feminino.

CONTEÚDO DO SPZ ENTRA NO CITOPLASMA DO OVÓCITO

MP e mitocôndrias ficam para trás.
Cauda degenera.

PRONÚCLEO MASCULINO

Núcleo do espermatozóide aumenta para formar o pronúcleo masculino

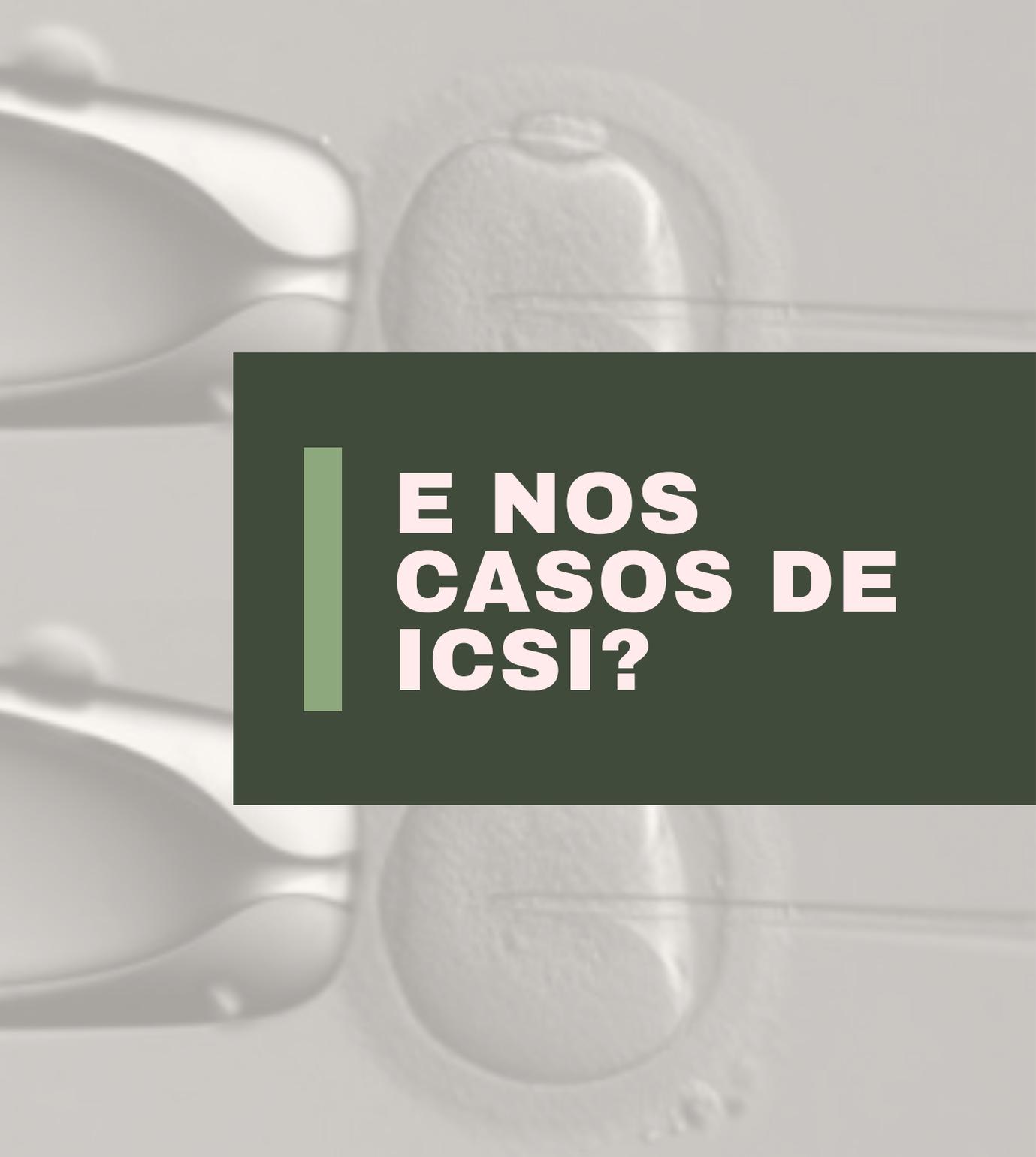


FORMAÇÃO DO ZIGOTO

Crescimento dos pronúcleos - Replicação do DNA haplóide em duas cromátides - Reorganização em fuso mitótico único

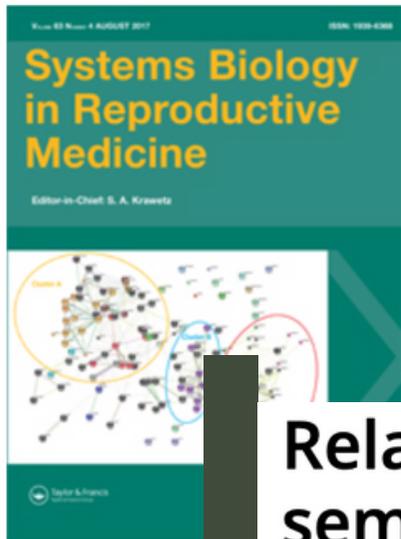
PLC Z

**MOLÉCULA COM PAPEL
FUNDAMENTAL PARA
DESENCADear O
DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO?**



**E NOS
CASOS DE
ICSI?**

PLCZ SE MANTEM
COMO
MOLÉCULA
FUNDAMENTAL
PARA ATIVAÇÃO
DO OÓCITO?



Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalaei, Abbas Kiani-Esfahani & Mohammad H. Nasr-Esfahani

To cite this article: Marziyeh Tavalaei, Abbas Kiani-Esfahani & Mohammad H. Nasr-Esfahani (2017) Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status, *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 63:4, 259-268, DOI: [10.1080/19396368.2017.1298006](https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1298006)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/19396368.2017.1298006>

SYSTEMS BIOLOGY IN REPRODUCTIVE MEDICINE
2017, VOL. 63, NO. 4, 259-268
<http://dx.doi.org/10.1080/19396368.2017.1298006>

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

ESPERMOGRAMA

15% dos homens com análise de sémen normal são inférteis.

NÃO são avaliados: Integridade do DNA/protamina, capacitação, reação acrossômica, interação espermatozoide-oócito e ativação do oócito

Necessidade de testes funcionais

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

IFDNA

FDNA: ocorre durante a configuração da cromatina ou troca de histona por protamina.

Impacto já bem documentado: Concepção natural - FIV - ICSI.

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

DEFICIÊNCIA DE PROTAMINA

Cita estudos em animais que associam deficiência de protamina, FDNA e redução da fertilidade.

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

MATERIAIS E MÉTODOS

- 3-5 dias de abstinência.
- Critérios WHO 2010.
- Automatizada. Para avaliação de morfologia, pelo menos 200 células por amostra com magnificação de 100x.

ALTERAÇÃO DO ESPERMOGRAMA FOI QUE DETERMINOU OS GRUPOS PARA COMPARAÇÃO.

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

MATERIAIS E MÉTODOS

- PLCZ - Citometria de fluxo.
- IFDNA - TUNEL
- Deficiencia de Protamina - Indireta: Coloração com cromomicina A3 (CMA3)

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

MATERIAIS E MÉTODOS

EXCLUSÃO:

- Leucocitospermia
- Varicocele
- Febre/ infecção 90 d antes da coleta
- Alcohol em excesso e outras drogas
- Klinefelter's
- Cancer
- Amostras com > 1mi de cel redondas ou outros tipos.

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

RESULTADOS

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

Table 1. Comparison of semen parameters between men with normal ($n=32$) and abnormal ($n=23$) semen parameters.

Parameters	Normal semen parameters	Abnormal semen parameters	<i>P</i> -value
Sperm concentration (10^6 /ml)	74.84±5.21	26.82±4.62	0.001
Total sperm count (10^6 /ejaculate)	350.72±30.78	104.54±22.52	0.001
Total sperm motility (%)	62.65±2.08	35.56±3.46	0.001
Progressive sperm motility (%)	39.77±1.98	14.41±2.42	0.001
Abnormal sperm morphology (%)	95.43±0.21	98.26±0.20	0.001
Semen volume (ml)	5.12±0.38	3.63±0.31	0.004

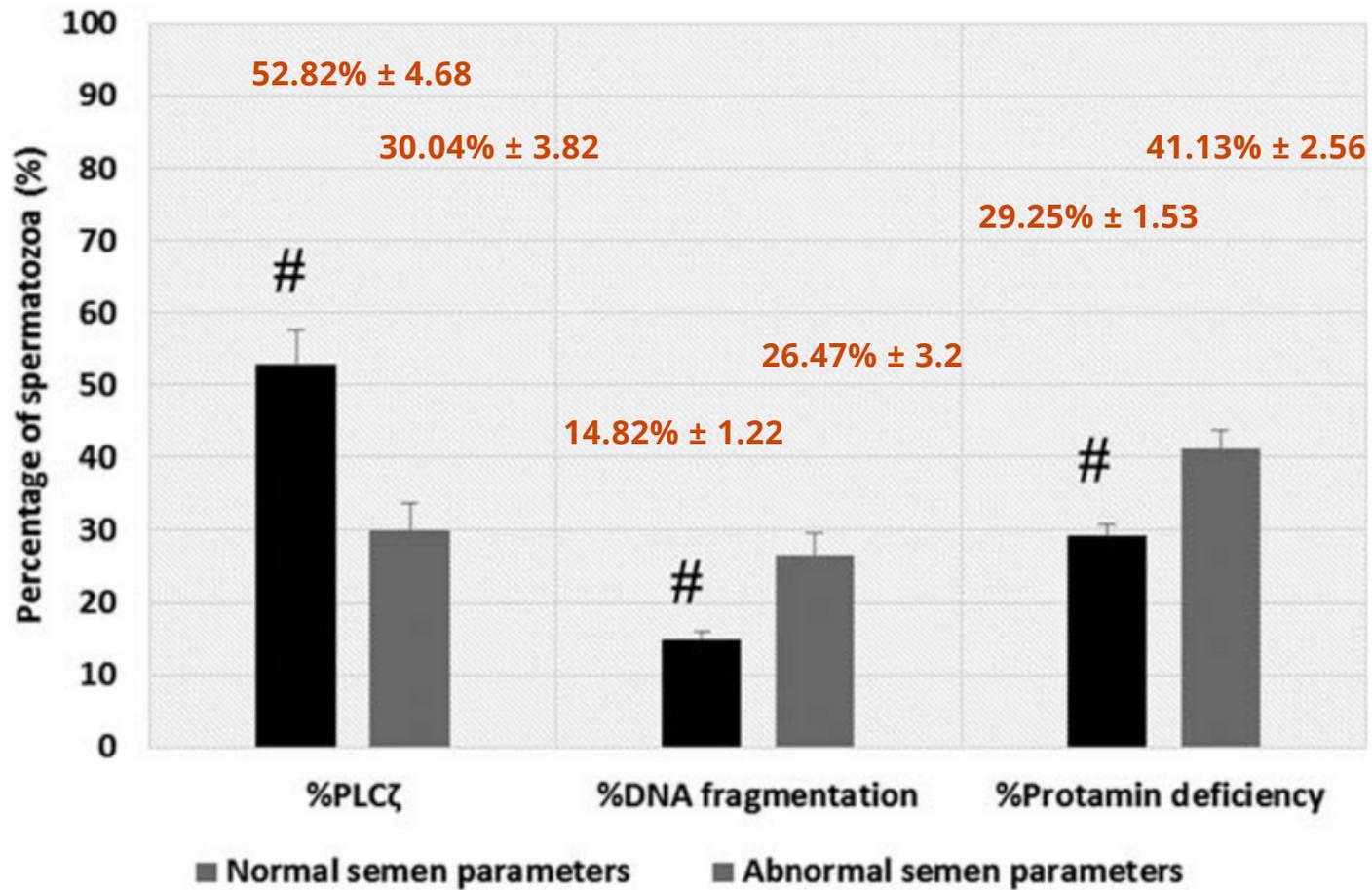
Data are presented as mean ± SEM and analyzed by independent-samples *t*-Test.

IDADE: 33.18±1.31 vs 31.01±1.7

Sem diferença estatística!

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}



Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

Table 2. Correlation between percentage of spermatozoa presenting DNA fragmentation, protamine deficiency, and PLC ζ with sperm concentration, sperm motility, and sperm abnormal morphology ($n=55$).

Parameters		Concentration (%)	Motility (%)	Abnormal morphology (%)
PLC ζ positive spermatozoa (%)	R	0.476**	0.430**	-0.317*
	P	0.001	0.001	0.012
DNA fragmented spermatozoa (%)	R	-0.173	-0.629**	0.434**
	P	0.207	0.001	0.001
Protamine deficient spermatozoa (%)	R	-0.343*	-0.342*	0.475**
	P	0.011	0.011	0.001

PLC ζ : phospholipase C-zeta. ****Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed);**
*Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

Table 3. Multiple regression analysis between sperm parameters and percentage of PLC ζ positive spermatozoa.

	Adjusted OR (95% CI)	P-value
Sperm concentration	1 (0.97-1.08)	0.33
Sperm motility (%)	1 (0.95-1.11)	0.461
Abnormal sperm morphology (%)	0.25 (0.08-0.78)	0.018
PLC ζ positive spermatozoa (%)		
% \leq 50	0.4 (0.04-4.8)	0.49
% $>$ 51 ^{ref}	-	-

PLC ζ : phospholipase C-zeta. Dependent variable in multinomial logistic regression with two categories; abnormal parameters were considered as reference category. OR: odd ratio; 95% CI: 95% confidence interval.

Morfologia seria preditiva para %PLC ζ ?

Seleção com base na morfologia pode ter um efeito na sua capacidade de induzir a ativação de oócitos com base na probabilidade de expressão de PLC ζ .

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

DISCUSSÃO

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

PRESENÇA E LOCALIZAÇÃO DE PLCZ
DEPENDEM DA **EXPRESSIONE**
ADEQUADA DESTES GENE



Estresse oxidativo
enfrentado durante a
ESPERMIOGÊNESE



FDNA vs %PLCZ

Nível de mRNA
Nível de proteína

**AINDA SEM ESTUDOS QUE MOSTREM A
CORRELAÇÃO DIRETA ENTRE O
ESTRESSE OXIDATIVO E A %PLCZ**

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

PRESENÇA E LOCALIZAÇÃO DE PLCZ
DEPENDEM DA **EXPRESSIONE**
ADEQUADA DESTES GENE



Estresse oxidativo
enfrentado durante a
ESPERMIOGÊNESE



FDNA vs %PLCZ

Nível de mRNA
Nível de proteína

**USO DE ANTIOXIDANTES
PODE MELHORAR
TAMBÉM A %PLCZ??**

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

%PLCZ

VANTAGENS DA CITOMETRIA DE FLUXO



Rápida e reprodutível

Oferece objetividade, precisão e poder de análise estatística em relação à microscopia.

Avaliação da FDNA já bem estabelecida.

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

IFDNA

MICROSCOPIA E FLUORECÊNCIA



**Limitação do método, uma vez que
varias análises do semen foram
realizadas.**

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

DEFICIÊNCIA DE PROTAMINA



SEM correlação significativa!!

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

ICSI
PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

> [Reprod Biomed Online](#). 2011 Aug;23(2):263-7. doi: 10.1016/j.rbmo.2011.04.006. Epub 2011 May 7.

Effects of cryopreservation and density-gradient washing on phospholipase C zeta concentrations in human spermatozoa

Junaid Kashir¹, Ariane Heynen, Celine Jones, Claire Durrans, Jo Craig, Joaquín Gadea, Karen Turner, John Parrington, Kevin Coward

Affiliations + expand

PMID: 21665540 DOI: [10.1016/j.rbmo.2011.04.006](#)

Gradiente de densidade poderia separar
espermatozóides com alto teor de PLC ζ

Relationship between phospholipase C-zeta, semen parameters, and chromatin status

Marziyeh Tavalae^a, Abbas Kiani-Esfahani^a, and Mohammad H. Nasr-Esfahani^{a,b}

Comparou amostras de semen normais vs alteradas.

Correlação com IFDNA.

Ponto de corte foi definido a partir da amostra do próprio estudo.

Sem correlação com resultados de ICSI

%PLCZ

PONTO DE CORTE PARA INDICAR ATIVAÇÃO OOCITÁRIA ARTIFICIAL??

Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability

Junaid Kashir, Ph.D.,^a Celine Jones,^a Ginny Mounce, M.Sc.,^a Walaa M. Ramadan, M.Sc.,^a Bernadette Lemmon, B.M.,^a Bjorn Heindryckx, Ph.D.,^c Petra de Sutter, M.D., Ph.D.,^c John Parrington, Ph.D.,^d Karen Turner, Ph.D.,^b Tim Child, M.D.,^b Enda McVeigh, M.D.,^b and Kevin Coward, Ph.D.^a

^a Nuffield Department of Obstetrics and Gynaecology, Women's Centre, John Radcliffe Hospital, Headington; and ^b Oxford Fertility Unit, Institute of Reproductive Sciences, Oxford, United Kingdom; ^c Department for Reproductive Medicine, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium; and ^d Department of Pharmacology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability

ICSI

Oócitos não conseguem fertilizar em 1% a 5% dos ciclos de ICSI.

Injeção incorreta de espermatozoides.

Expulsão do esperma injetado do oócito.

Falha na descondensação da cabeça.

DEFICIÊNCIA NO MECANISMO DE ATIVAÇÃO DO OÓCITO É CONSIDERADA A PRINCIPAL CAUSA DA FALHA NA FERTILIZAÇÃO OU DE UMA FERTILIZAÇÃO ANORMALMENTE BAIXA DEPOIS DA ICSI.

Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability

OBJETIVO

Imunofluorescência quantitativa da PLCZ.

Homens cujos ejaculados resultaram na ativação normal do oócito - Nível era semelhante?

O padrão de localização do PLCZ está ligado à capacidade normal de ativação do oócito??

ESPERMATOZOIDES DE PACIENTES QUE APRESENTAM FALHA RECORRENTE DE ICSI

Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability

MATERIAIS E MÉTODOS

GRUPO ESTUDO

Pelo menos oito oócitos do mesmo paciente não conseguiram fertilizar após ICSI, ou quando a opinião clínica experiente indicou possíveis problemas de ativação.

Uma história de falha de ICSI ou morfologia espermática anormal.

Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability

MATERIAIS E MÉTODOS

GRUPO CONTROLE

Homens cujos espermatozoides foram capazes de resultar em taxas bem-sucedidas de fertilização e ativação de oócitos após RA.

Homens com fertilidade comprovada (filhos anteriormente sem o uso de RA).

Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability

MATERIAIS E MÉTODOS

GRADIENTE DE DENSIDADE PARA TODAS AS AMOSTRAS.

PLCZ por imunofluorescência.

Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability

RESULTADOS

Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability

TABLE 1

Summary of male age, sperm morphology, motility grades, and motility count after density-gradient washing (DGW), and outcome of assisted reproductive technology (ART) procedure used.

	Male age, y	Female age, y	Morphology	Motility after DGW, %				Motile count, $\times 10^6$ /mL	ART procedure	Oocytes fertilized/used, n (%)
				a	b	c	d			
Control 6	36	34	Normal	85	4	1	10	18.07	IVF	6/7 (85.7)
Control 7	32	30	Normal	91	0	0	9	7.55	ICSI	6/8 (75)
Control 8	44	41	Normal	88	6	0	6	12.0	IVF	5/6 (83.3)
Control 9	32	30	Normal	70	16	7	7	7.4	IVF	2/2 (100)
Control 10	38	37	Normal	96	0	0	4	11.6	IVF	7/10 (70)
Control 11	37	37	Normal	94	1	2	3	10.5	IVF	10/19 (52.6)
Control 12	37	31	Normal	84	4	5	7	20.3	IVF	6/11 (54.5)
Control 13	42	40	Normal	76	11	9	4	10.35	IVF	13/16 (81.3)
Control 14	54	40	Normal	71	17	0	12	19.6	IVF	11/14 (78.6)
Control 15	36	33	Normal	83	9	0	8	9.4	IVF	6/6 (100)
Control 16	39	36	Normal	25	26	7	42	36.21	N/A	N/A
Patient 1	53	36	Normal	66	13	0	20	5.6	ICSI	0/4 (0)
Patient 2	36	34	Abnormal head morphology	5	16	0	79	2.2	ICSI	6/18 (33.3)
Patient 3	40	41	Normal	13	11	6	70	0.96	ICSI	0/5 (0)
Patient 4	39	40	Normal	70	4	0	20	4.8	ICSI	0/6 (0)

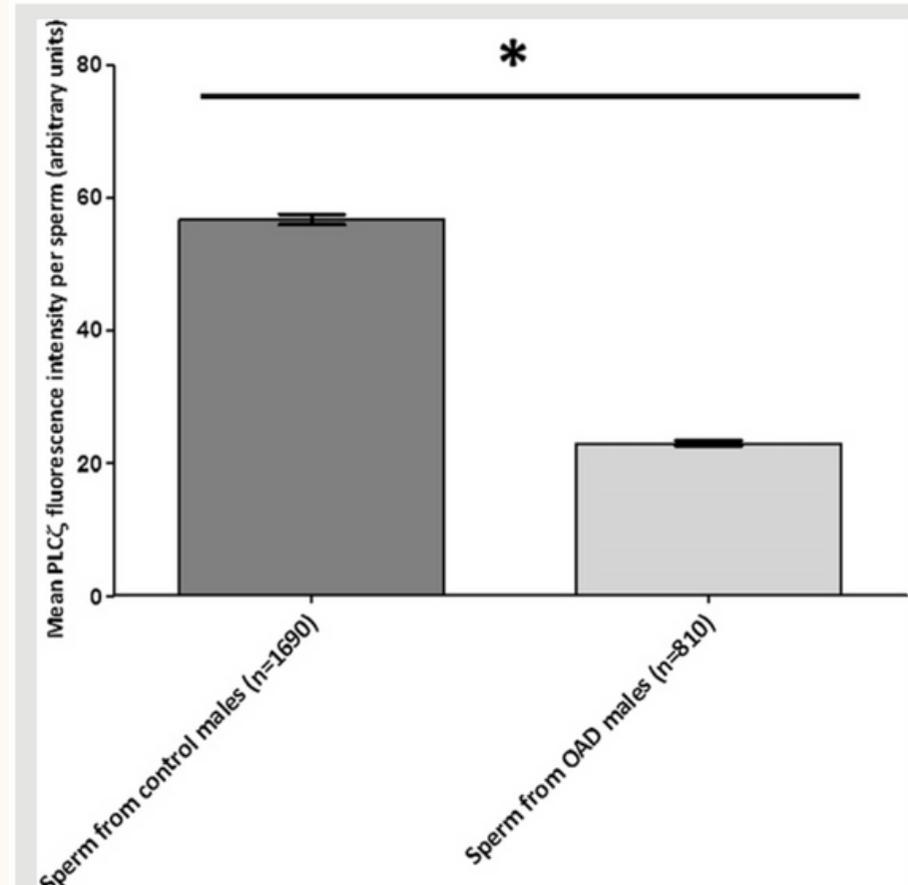
Patient H398P From the Department of Reproductive Medicine, University of Ghent, Belgium; clinical details previously described by Heytens et al. (2009)

Note: Patients were recruited at the Oxford Fertility Unit (OFU), with the exception of Patient H398P. Oocyte activation-deficient (OAD) patients recruited from OFU had previously failed an ICSI cycle. These data were not available for Controls 1–5, because they were not undergoing fertility treatment. All of those control subjects were men with no history or indication of male infertility. Fertilization was not attempted with sperm from Control 16, because that subject had previously successfully undergone IVF treatment, following which he was recruited and provided a sperm sample for this study. Information regarding sperm from Patient H398P is available in Heytens et al. (33). IVF = in vitro fertilization; ICSI = intracytoplasmic sperm injection.

Kashir. PLC- ζ as an indicator of human sperm activation ability. *Fertil Steril* 2013.

Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability

PLC ζ

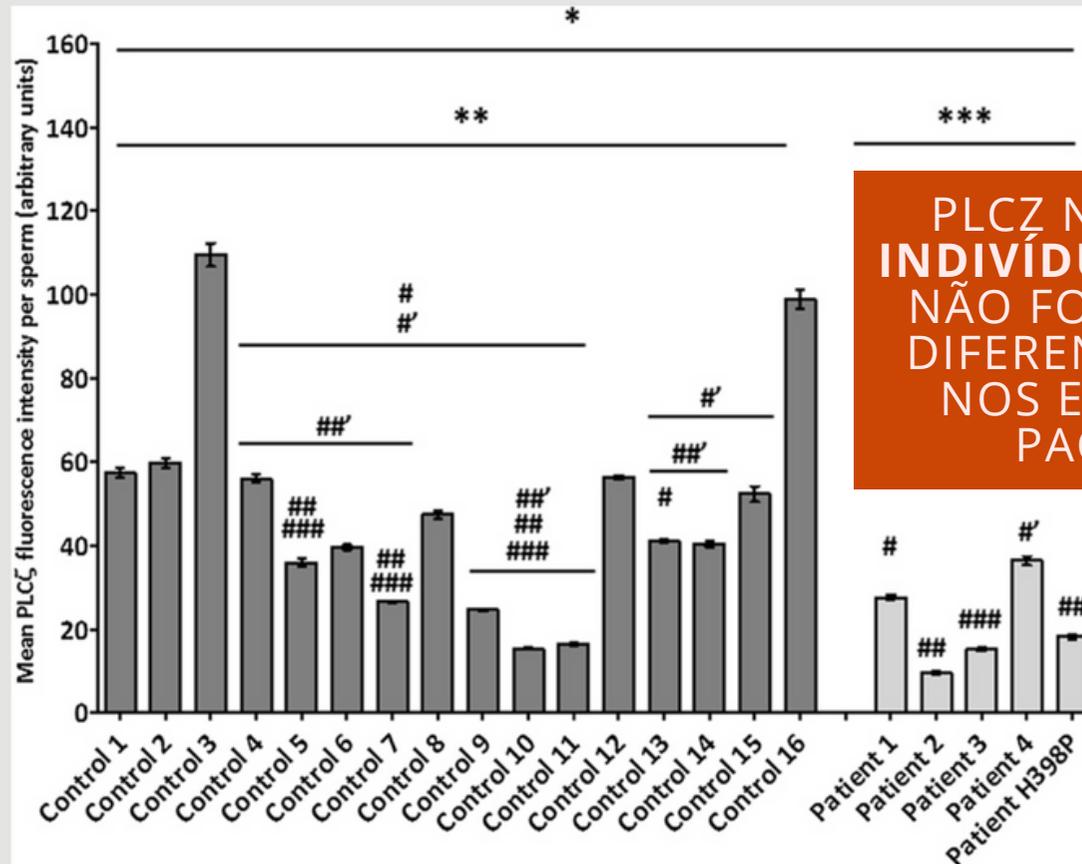


Mean relative total phospholipase C zeta (PLC- ζ) fluorescence levels exhibited by control and oocyte activation-deficient (OAD) patient sperm. Fluorescence intensity was quantified in arbitrary units with the use of ImageJ software. Asterisk (*) denotes a statistically significant difference ($P \leq .05$). Data are shown as mean \pm SEM.

Kashir. PLC- ζ as an indicator of human sperm activation ability. *Fertil Steril* 2013.

Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability

FIGURE 1

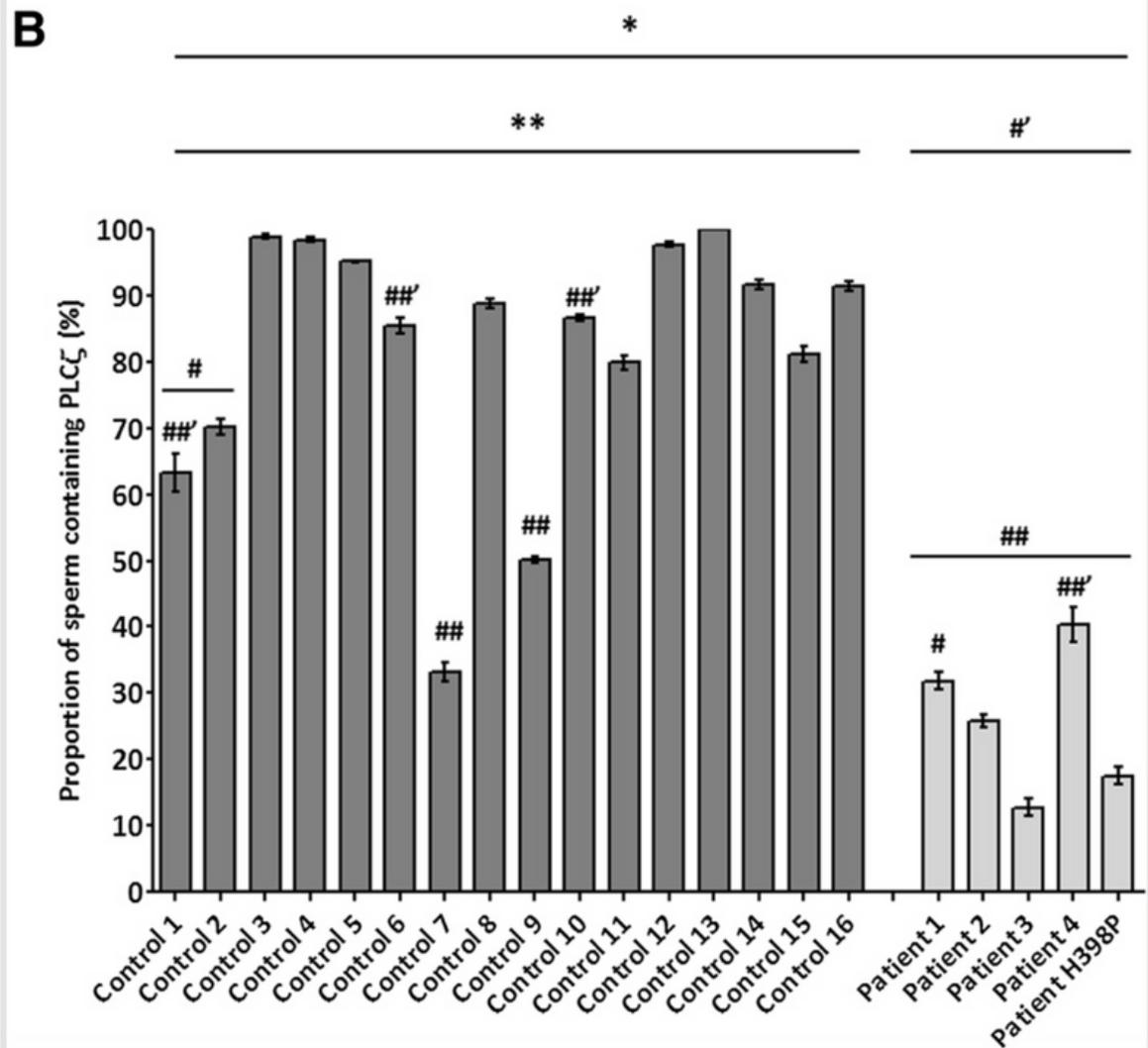
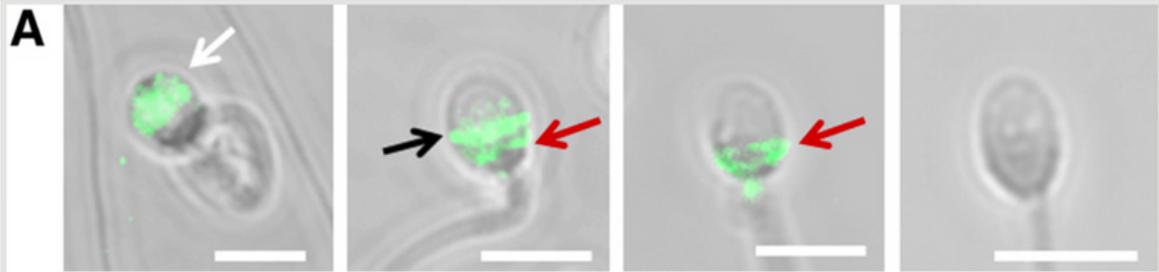


PLC ζ NOS SPZ DE 10 DOS 16 INDIVÍDUOS CONTROLE (62,5%) NÃO FOI SIGNIFICATIVAMENTE DIFERENTE DOS NÍVEIS TOTAIS NOS ESPERMATOZOIDES DE PACIENTES COM OAD

Mean relative total phospholipase C zeta (PLC- ζ) fluorescence levels exhibited by sperm from individual control and oocyte activation-deficient (OAD) patients. Fluorescence intensity was quantified in arbitrary units using ImageJ software. Asterisks (*, **, ***) denote statistically significant differences ($P \leq .05$), whereas hash marks (#, ##, ###; #', ##', ###') denote statistically insignificant differences. Combinations of marks indicate comparisons between different groups (e.g., # indicates comparison with one group, and ## indicates comparison with another). Data are shown as mean \pm SEM.

Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability

*SIGNIFICANTE
#INSIGNIFICANTE



Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability

DISCUSSÃO

Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability

**VARIAÇÃO NOS NÍVEIS DE PLCZ
TOTAL NOS ESPERMATOZOIDES
CONTROLE**



Nem todos os isolados após DGW e exibindo imunofluorescência de PLC-z sejam capazes de induzir a ativação do oócito ou iniciar o desenvolvimento embrionário.

Estudos futuros devem examinar se a variação na proteína PLCZ no esperma humano se correlaciona com **padrões variáveis de liberação de Ca²⁺**.

Variance in total levels of phospholipase C zeta (PLC- ζ) in human sperm may limit the applicability of quantitative immunofluorescent analysis as a diagnostic indicator of oocyte activation capability

VARIAÇÃO NOS NÍVEIS DE PLCZ TOTAL NOS ESPERMATOZOIDES CONTROLE.

A IMUNOFLUORESCÊNCIA QUANTITATIVA PODE NÃO SER UM INDICADOR PROGNÓSTICO CLINICAMENTE VIÁVEL DA CAPACIDADE DE ATIVAÇÃO DO OÓCITO.



Sollirium
ENSINO E PESQUISA

ANDROMONDAY

FOSFOLIPASE CZ

Fator masculino e suas
implicações na ICSI.

Tiago Magalhães

Fellow Andrologia