Karla Ribeiro de Castro

**Efeitos da exposição crônica à poluição atmosférica urbana sobre a
receptividade uterina: estudo morfo-funcional do remodelamento
celular do endométrio e expressão de fatores envolvidos na preparação
para a implantação embrionária**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Dra. Mariana Matera Veras

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.
A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Castro, Karla Ribeiro de

Efeitos da exposição crônica à poluição atmosférica urbana sobre a receptividade uterina : estudo morfo-funcional do remodelamento celular do endométrio e expressão de fatores envolvidos na preparação para a implantação embrionária / Karla Ribeiro de Castro. -- São Paulo, 2013.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Mariana Matera Veras.

Descritores: 1.Implantação do embrião 2.Poluição do ar 3.Camundongos 4.Fator inibidor de leucemia 5.Mucina-1 6.Interleucina-1 beta 7.Interleucina-6 8.Endométrio/ultraestrutura

USP/FM/DBD-176/13

Ao meu eterno amor, Henrique Prado Torres;

À minha orientadora, Dr^a. Mariana Matera Veras;

Sem vocês, este sonho não teria se tornado realidade.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora e professora Dr^a. Mariana Matera Veras, minha imensa gratidão por ter me aceito como aluna, pelos ensinamentos, paciência e principalmente por ter acreditado em mim para a realização deste trabalho;

Ao meu marido Henrique Prado Torres, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando em todas as minhas decisões, sem você nada disso seria possível;

À Prof^a. Dr^a. Élia Garcia Caldini, pela sua confiança e por ter me aceito em seu laboratório;

Aos meus pais, que mesmo distantes, sempre me incentivaram;

À amiga Júlia, por todo carinho, ajuda e confiança desde que nos conhecemos;

À Dr^a. Maria Angélica Peres, pela ajuda nos lavados uterinos, pelos seus ensinamentos e conselhos e por sua amizade;

À Dr^a. Monique Matsuda e Paloma Krempel pela ajuda nas análises de qPCR e amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário do Nascimento Saldiva e Prof. Dr. Luiz Fernando da Silva, pelas aulas no PAE;

À Maria Ires Amorim, pela paciência em me ensinar as técnicas de histologia;

Ao Dr. Marcelo Ferreira, Adão, Cecília, Mírian, Hélio e Margot, pelo auxílio e realização das telas de microscopia eletrônica de transmissão;

À Dr^a. Rose Eli Rici, pelo auxílio na realização das lindas imagens de microscopia eletrônica de varredura;

Ao Dr. Rodolfo de Paula Vieira e Dr^a. Ana Paula Ligeiro de Oliveira, pelo auxílio na avaliação das citocinas;

À Ângela Batista Gomes dos Santos e Maria Cristina Rodrigues Medeiros, pela confecção das lâminas de imuno-histoquímica;

Aos amigos, Gabriel, Natália, Carina e Adair, pelo companheirismo, amizade e colaboração nos experimentos;

Aos meus amigos Beto, Leandro, Manu e Amanda, que entenderam todas as vezes que tive que ir embora mais cedo de nossas festas;

À todos que diretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Às agências CAPES e FAPESP, pelo apoio financeiro.

"A goal without a plan is just a wish".

Antoine de Saint-Exupery

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de quadros

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Poluição atmosférica.....	2
1.1.1 Histórico.....	2
1.1.2 Classificação, níveis recomendados e órgãos reguladores da poluição atmosférica.....	4
1.1.3 Material particulado.....	8
1.2 Evidências epidemiológicas e experimentais sobre os efeitos adversos da exposição à poluição do ar sobre a gestação e sobre o sistema reprodutor feminino.....	9
1.2.1 Estudos epidemiológicos.....	9
1.2.2 Evidências experimentais.....	13
1.3 Prováveis pontos de vulnerabilidade tóxica envolvidos nas perdas implantacionais.....	15
1.4 Ciclo menstrual em humanos e remodelamento endometrial.....	16
1.5 Ciclo estral em camundongos e remodelamento endometrial.....	19
1.6 Implantação embrionária e receptividade uterina.....	20
1.7 Fatores envolvidos na receptividade uterina, comuns aos humanos e camundongos.....	23
1.7.1 Pinopódios.....	23

1.7.2 Fator inibidor de leucemia (LIF).....	25
1.7.3 Mucinas (Muc-1).....	26
1.7.4 Interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6).....	27
2 JUSTIFICATIVA.....	28
3 OBJETIVO GERAL.....	29
3.1 Objetivos específicos.....	29
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Protocolo de Exposição.....	31
4.2 Caracterização da exposição.....	33
4.3 Avaliação da receptividade uterina.....	34
4.3.1 Ciclo estral.....	34
4.3.2 Coleta dos materiais.....	36
4.3.3 Estereologia das estruturas uterinas.....	37
4.3.4 Avaliação da espessura dos compartimentos uterinos, epitélio luminal e glândulas endometriais.....	39
4.3.5 Avaliação das alterações nos folículos ovarianos.....	41
4.3.6 Avaliação imuno-histoquímica: MUC-1 e LIF.....	43
4.3.7 Avaliação da Expressão gênica de MUC-1 e LIF no endométrio.....	45
4.3.8 Avaliação dos níveis de IL-1 β e IL-6.....	48
4.3.9 Estudo ultraestrutural do epitélio luminal endometrial: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	49
4.4 Análise estatística.....	51
5 RESULTADOS.....	51
5.1 Avaliação dos filtros de polycarbonato e quartzo.....	51
5.2 Ciclicidade estral.....	55

5.3 Alterações nos folículos ovarianos.....	57
5.4 Parâmetros volumétricos dos compartimentos uterinos.....	60
5.5 Parâmetros volumétricos dos compartimentos endometriais.....	60
5.6 Espessura dos compartimentos uterinos.....	62
5.7 Expressão gênica de MUC-1 e LIF.....	65
5.8 Avaliação imuno-histoquímica: MUC-1 e LIF.....	66
5.9 Dosagem dos níveis de IL-1 β e IL-6.....	69
5.10 Estudo ultraestrutural do epitélio luminal endometrial: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	70
6 DISCUSSÃO.....	71
7 CONCLUSÃO.....	86
8 ANEXOS.....	87
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

µm - Micrômetro

AVMA - *American Veterinary Medical Association*

BPN - Baixo peso ao nascer

BSA – *Bovin Serum Albumin*

Cd - Cádmio

cDNA - Ácido desoxirribonucleico complementar

CETESB - Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CI - Intervalo de confiança

CME – Camada muscular externa

CMI – Camada muscular interna

CO - Monóxido de carbono

CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente

CONSEMA – Conselho Estadual do Meio Ambiente

CPA - Concentrador de partículas ambientais

CT - *Threshold Cycle*

DAB - Diaminobenzidina

DEPC – Dietilpirocarbonato

DG – Dia gestacional

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DPC - Dia pós-coito

DPN - Dia pós-nascimento

EGF - *Epidermal Growth Factor*

ELISA - *Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay*

EUA - Estados Unidos da América

Et al. – e outros

FMUSP – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

FMVZ-USP – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

FSH - Hormônio Folículo Estimulante

g – Grama

GC/MS - Gas chromatography mass spectrometry

HEPA - *High Efficiency Particulate Air*

HPA - Hidrocarboneto policíclico aromático

HPLC/Flu - *High performance liquid chromatography with fluorescence detection*

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

IGF-1 - *Insulin-like Growth Factor 1*

IL-1 - Interleucina-1

IL-1ra - Receptor de Interleucina-1

IL-1Rtl - Receptor de Interleucina1 tipo I

IL-1RtII - Receptor de Interleucina1 tipo I

IL-6 - Interleucina-6

LH - Hormônio luteinizante

LIF – Fator inibidor de leucemia

m³ - Metro cúbico

MET - Microscopia eletrônica de transmissão

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

mg - Miligrama

MP - Material particulado

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

MUC-1 - Mucina

NAAQS - *National Ambient Air Quality Standards*

ng - Nanograma

nm - Nanômetro

NO₂ - Dióxido de nitrogênio

O₃ – Ozônio

OD – Densidade Óptica

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAS - *Periodic Acid Schiff*

Pb - Chumbo

PBS - *Phosphate buffered saline*

PCR - *Polimerase Chain Reaction*

PFA - Paraformaldeído

PPB - Parte por bilhão

PPM - Parte por milhão

PTS - Partículas Totais em Suspensão

RPM – Rotação por minuto

SO₂ - Dióxido de enxofre

U.S.EPA - *United States Environmental Protection Agency*

Vv - Fração de volume

WHO - *World Health Organization*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Oligonucleotídeos usados no ensaio de PCR em tempo real.....	45
Tabela 2 – Análise descritiva da composição elementar de $MP_{2,5}$ ($\mu g/m^3$) dos filtros de polycarbonato utilizado na exposição de fêmeas de camundogos Blab/C, no período de março de 2011 a junho de 2011. Os dados estão apresentados em média e desvio padrão.....	52
Tabela 3 – Valores referentes à aplicação da técnica de análise de componentes principais, para o conjunto de dados das medidas elementares dos filtros de material particulado fino concentrado.....	53
Tabela 4 – Caracterização da fração orgânica do $MP_{2,5}$ analisada em filtros recolhidos durante o período de exposição. Valores são apresentados em média (ng/m^3 , nanogramas por metros cúbicos de ar) por 16 filtros.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo ovariano e menstrual em humanos.....	17
Figura 2 - Variações nos níveis de progesterona e estrógeno durante o ciclo estral em camundongos.....	20
Figura 3 – Representação da aposição do blastocisto. Vias de sinalização dos principais fatores envolvidos na receptividade uterina. LIF – Fator inibidor de leucemia; IL-1- Interleucina-1; IL-6 – Interleucina 6.....	22
Figura 4 - Eletromicrografia de varredura da superfície apical do epitélio luminal endometrial em humano (a), camundongo (b) e rato (c) durante seu estado receptivo evidenciando os pinopódios.....	24
Figura 5 - Esquema representativo do protocolo de exposição.....	32
Figura 6 - (A) câmara de exposição ao ar ambiente e as partículas ambientais concentradas (MP2,5); (B) Vista lateral dos impactadores virtuais, tendo ao fundo as câmaras de exposição.....	33
Figura 7 - Fotomicrografias de lavados vaginais de camundongos. (A) proestro, predominância de células epiteliais nucleadas; (B) estro, presença de células cornificadas anucleadas; (C) metaestro, que consiste em três tipos de células: leucócitos, cornificadas e epiteliais nucleadas; (D) diestro, constituídos predominantemente por leucócitos.....	35
Figura 8 - Locais de secção do corno uterino de camundongo.....	37
Figura 9 - Representação e corte histológico do corno uterino – 5µm. Coloração: H&E. CME – Camada muscular externa (Miométrio); CMI – Camada muscular interna (Miométrio); E – Endométrio; EL – Epitélio luminal; G - Glândula; L – Luz uterina; PAM – Pólo antimesometrial.....	38

Figura 10 – Fotomicrografia do corno uterino de fêmea de camundongo com sistema teste de pontos realizado pelo software Image J para estimarmos os volumes dos compartimentos uterinos. Aumento: 4x. coloração: H&E.....39

Figura 11 – Fotomicrografia do corno uterino de fêmea de camundongo exposta ao MP_{2,5}. Medidas das espessuras do endométrio e do miométrio selecionados em forma de “X”. Coloração: PAS + *Alcian Blue* – 500µm.....40

Figura 12 – Fotomicrografia do corno uterino de fêmea de camundongo exposta ao MP_{2,5}. Medidas das espessuras dos epitélios glandular e luminal. Coloração: PAS + *Alcian Blue* - 200µm.....41

Figura 13 – Cortes histológicos (5µm) dos ovários de fêmea de camundongo. FS- Folículo secundário; CL – Corpo lúteo; FP- Folículo primário e FM – Folículo maduro. Coloração: H&E. Aumento: 4x.....43

Figura 14 – Fotomicrografias decomposta pelo software Image J do corte histológico do corno uterino de fêmea de camundongo com o auxílio da ferramenta “*colour decovolution*”44

Figura 15 – Representação gráfica do número de ciclos estrais de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. Observa-se um aumento no número de ciclos estrais nas fêmeas expostas a concentração de 1200µg/m³ de MP_{2,5} quando comparado ao Ar Filtrado e ao grupo 600µg/m³55

Figura 16 – Representação gráfica do comprimento do ciclo estral de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. Observa-se uma diminuição no comprimento médio do ciclo estral de fêmeas expostas a 1200µg/m³ de MP_{2,5} quando comparadas ao grupo Ar Filtrado.....56

Figura 17 – Representação gráfica da proporção de dias em estro de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e

1200µg/m³ de MP_{2,5}. A proporção média dos dias em estro analisados em fêmeas de camundongos expostas a concentração de 1200µg/m³ mostra-se reduzida quando comparada ao grupo Ar Filtrado.....56

Figura 18 – Representação gráfica do número de corpos lúteos presente no ovário de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. O número de corpos lúteos presentes nos ovários dos animais expostos as concentrações de MP_{2,5} não apresentou alteração significativa quando comparado aos animais expostos ao ar filtrado.....58

Figura 19 – Representação gráfica do peso corporal de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. O peso corporal (g) das fêmeas de camundongos expostas à poluição particulada não apresentou alteração significativa quando comparado aos animais expostos ao ar filtrado.....58

Figura 20 – Representação gráfica dos pesos do ovário de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. As fêmeas de camundongos expostas a 1200µg/m³ de MP_{2,5} apresentaram maior peso dos ovários (g) quando comparado a ambos os grupos Ar Filtrado e 600µg/m³.....59

Figura 21 – Representação gráfica da razão (peso do ovário/peso corporal) de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. Observa-se um aumento significativo apenas para os animais expostos a concentração de 1200µg/m³ quando comparado aos animais expostos a 600µg/m³.....59

Figura 22 – Representação gráfica da densidade de volume do endométrio, miométrio e do lúmen uterino de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. A exposição à poluição particulada (MP_{2,5}) não interferiu sobre a densidade volumétrica dos compartimentos uterinos na fase inicial da gestação.....60

Figura 23 – Efeitos da exposição à poluição particulada (MP_{2,5}) sobre a composição volumétrica dos compartimentos endometriais na fase inicial da gestação em fêmeas de Camundongo Balb/C (4^o DG). Os animais expostos à concentração de 600µg/m³ apresentaram um aumento na proporção glandular quando comparado ao grupo Ar Filtrado. Os animais expostos à concentração de 1200µg/m³ apresentaram uma redução na proporção glandular quando comparado ao grupo 600µg/m³ e um aumento na proporção estromal quando comparado ao grupo 600µg/m³.....62

Figura 24 – Representação gráfica da espessura do epitélio glandular e do epitélio luminal de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. A exposição a concentração de 600 µg/m³ de MP_{2,5} provocou o aumento na espessura dos epitélios luminal e glandular do endométrio destes animais. Os animais expostos à concentração de 1200µg/m³ apresentaram apenas um aumento na espessura do epitélio glandular quando comparado ao grupo Ar Filtrado.....63

Figura 25 – Representação gráfica da espessura do endométrio e do miométrio de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. Não foi observado alterações entre os grupos.....64

Figura 26 – Representação gráfica do diâmetro das glândulas presentes no endométrio de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. O diâmetro (µm) das glândulas uterinas dos animais expostos às duas concentrações de MP_{2,5} sofreram aumentos significativos quando comparados aos animais que receberam ar filtrado.....64

Figura 27 – Representação gráfica da expressão reativa do gene LIF no corno uterino de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. A expressão gênica de LIF não se mostrou

alterada em fêmeas de camundongo expostas a duas concentrações (600µg/m³ e 1200µg/m³) durante o período implantacional.....65

Figura 28 – Representação gráfica dos efeitos da exposição à poluição particulada (MP_{2,5}) a proporção média de área imunomarcada para LIF na fase inicial da gestação em fêmeas de Camundongo Balb/C (4º DG). Observa-se uma diminuição significativa na expressão de LIF no epitélio luminal, nas glândulas e estromas endometriais nos grupos expostos ao MP_{2,5}.....67

Figura 29 – Representação gráfica da área imunomarcada para MUC-1 no epitélio luminal de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. A exposição às duas concentrações de MP_{2,5} não alterou a expressão de MUC-1 no epitélio luminal do corno uterino de fêmeas de camundongos (4º DG).....68

Figura 30 – Fotomicrografia de secções histológicas do epitélio luminal, glândulas e estroma endometrial de fêmeas de camundongos expostas ao ar filtrado (ADG), 600µg/m³ (BEH) e 1200µg/m³ (CFI). Escala: 50µm.....68

Figura 31 – Representação gráfica da concentração média das interleucinas IL-1β e IL-6 no lavado uterino de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. A concentração média das interleucinas avaliadas no lavado uterino de fêmeas de camundongo expostas a 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5} não apresenta alteração significativa quando comparado ao grupo Ar Filtrado.....69

Figura 32 – Efeito de exposição pré-gestacional a duas concentrações de MP_{2,5} ou ar filtrado sobre as características ultraestruturais do epitélio luminal uterino de camundongos no 4ºDG. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do revestimento uterino de fêmeas de camundongos expostas ao ar filtrado (AD) mostrando a distribuição dos pinopódios (seta) nas pregas da mucosa uterina; 600µg/m³ de MP_{2,5} (BE) mostra uma redução

no número de pinopódios e irregularidade no tamanho destas estruturas (seta); 1200µg/m³ de MP_{2,5} (CF) a presença destas estruturas é rara, tratando-se pequenas protusões; GHI – Eletrofotomicrografia da membrana plasmática apical das células epiteliais uterinas de fêmeas de camundongos demonstrando a presença de pinopódios (seta) em fêmeas expostas ao ar filtrado (G) e microvilosidades (seta) nos animais expostos a 600µg/m³ de MP_{2,5} (H) e 1200µg/m³ de MP_{2,5} (I).....71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais poluentes indicadores da qualidade do ar, suas características e principais fontes.	5
Quadro 2 - Principais poluentes do ar e níveis máximos de concentração permitidos no ar.	6
Quadro 3 – Classificação dos estágios do ciclo estral de acordo com a citologia vaginal.	35

RESUMO

Castro, KR. *Efeitos da exposição crônica à poluição atmosférica urbana sobre a receptividade uterina: estudo morfo-funcional do remodelamento celular do endométrio e expressão de fatores envolvidos na preparação para a implantação embrionária*. [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2013.

Evidências epidemiológicas associam diferentes fatores ambientais, tais como poluição e ingestão de alimentos contaminados, com desfechos gestacionais negativos e fertilidade diminuída em humanos. Não há dúvidas de que a poluição do ar nos grandes centros urbanos é capaz de provocar desfechos negativos sobre a gestação: baixo peso ao nascer, prematuridade, perda gestacional, entre outros. Entretanto, poucos estudos foram conduzidos para avaliar um possível efeito da exposição à poluição ambiental particulada do ar sobre a saúde reprodutiva feminina. O objetivo deste trabalho foi avaliar se a exposição subcrônica a poluição atmosférica particulada da cidade de São Paulo é capaz de alterar a receptividade uterina à implantação embrionária. Para tanto, foram avaliados 3 grupos de fêmeas de camundongos (n=10), expostas cronicamente desde o período de desmame (PND21) até atingirem a idade reprodutiva (PND60) à duas concentrações de $MP_{2,5}$ ($600\mu g/m^3$ ou $1200\mu g/m^3$) ou ar filtrado. Diferentes parâmetros relacionados à fertilidade e a receptividade uterina foram avaliados. Nossos achados mostram que a exposição ao material particulado de origem veicular provoca alterações na ciclicidade estral prévia ao acasalamento, bem como um aumento no peso dos ovários. Avaliação da reserva folicular indica que há um aumento na quantidade de folículos médios associado à exposição a menor concentração de MP ($p=0,04$). A avaliação histopatológica do tecido uterino revelou que há aumentos na fração de volume das glândulas uterinas ($600\mu g/m^3$; $p=0,01$); o epitélio glandular ($p=0,001$) e luminal ($p=0,03$) estão espessados e o diâmetro médio das glândulas uterinas foi maior nos grupos expostos ao MP ($p=0,004$). A análise qualitativa da distribuição de pinopódios no epitélio luminal por

microscopia eletrônica de varredura e transmissão indica que há uma redução na presença destas estruturas. A avaliação da expressão de LIF por imunomarcação mostrou-se reduzida no epitélio luminal ($p<0,001$), nas glândulas ($p<0,001$) e estroma ($p=0,004$) nas fêmeas expostas ao MP, porém nenhuma diferença foi observada na expressão de MUC-1 (mucina). Entretanto quando avaliadas a expressão gênica de MUC-1 e LIF no tecido uterino e os níveis de IL-1 β e IL-6 no fluído uterino nenhuma diferença foi observada entre os grupos. Com base em nossos achados conclui-se que a exposição à poluição particulada do ar de origem veicular pode estar envolvida no aumento das perdas gestacionais e/ou implantacionais pelo comprometimento da receptividade uterina provavelmente pelo prejuízo do remodelamento uterino necessário a implantação.

Descritores: implantação do embrião; poluição do ar; camundongos; fator inibidor de leucemia; mucina-1; interleucina-1 beta; interleucina-6; endométrio/ultraestrutura.

SUMMARY

Castro, KR. *Effects of chronic exposure to urban ambient air pollution on uterine receptivity: morphofunctional study of the cellular remodeling of the endometrium and on the expression of factor involved in embryo implantation*. [Dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2013.

Epidemiological evidences have shown that environmental factors, such as environmental pollution and ingestion of contaminated food, are associated with negative gestational outcomes and decreased fertility in human. There is no doubt that exposure to air pollution in large urban areas are capable of impairing health (e.g. hypertension) and of aggravating preexisting diseases (e.g asthma). However, the effects of air pollution exposures on female reproductive health are lesser known. Previous experimental studies have shown that low birth weights are reduced and embryonic implantational index are reduced in animals exposed to ambient levels of air pollution. The aim of this study was to evaluate if sub chronic exposures to particulate air pollution before pregnancy and during the initial stages is capable to alter the uterine receptivity of mice. To test this, 3 groups of female mice were continually exposed from 21st to 60th postnatal day to either filtered or two different doses of concentrated ambient particles (MP_{2,5} - 600µg/m³ or 1200µg/m³) with the aid of a Ambient Particle Concentrator and different parameters associated with fertility and uterine receptivity were evaluated. Our data have shown that exposures to particulate air pollution from vehicular origin are associated to changes in estrous cyclicity, cycles are shorter and the number of days in estrous reduced. Evaluation of the follicular reserve also indicates that animals exposed to MP present an increased number of ovarian medium follicles (p=0.04). Histopathological evaluation of the uterine tissue revealed increases in the volume fraction of uterine glands (p= 0.01) of those animals exposed to 600µg/m³. The luminal (p= 0.03) and glandular epithelium (p= 0,001) are thicker and the uterine glands diameters (p=0,004) were greater in

exposed animals. Qualitative analysis by transmission and scanning electron microscopy indicates that there is a reduction in the presence of pinopódios in the luminal epithelium of PM exposed females. The expressions of LIF assessed by immunohistochemistry in those females exposed to PM were reduced in the luminal epithelium ($p<0,001$), and in the glandular ($p<0,001$) and stromal compartments as well. However no differences in the expression of MUC-1 were seen. Gene expression of LIF and MUC-1 in the whole endometrium (qPCR) and the expression of IL-6 and IL-1 β in the uterine fluid did not show significant difference between the groups tested. In conclusion, our data have shown that exposures to ambient air particulate pollution can be associated with increased rates of implantational losses due to changes in the uterine receptivity related to factors involved in uterine remodeling for pregnancy.

Descriptors: embryonic implantation; air pollution; mice; leukemia inhibitory factor; mucin-1; interleukin-1 beta; interleukin-6; endometrium/ultraestructure.

1 INTRODUÇÃO

Desde os anos 80 tem se observado um declínio na taxa de natalidade, o que pode indicar uma redução na fertilidade humana e sugere um potencial declínio da fecundabilidade (WHO, 2003, 2005).

Há evidências suficientes de que a exposição à poluição do ar é capaz de afetar a função reprodutiva. Efeitos sobre a fertilidade, gestação, e desenvolvimento fetal (Glinianaia et al., 2004; Srám et al., 2005) são descritos na literatura. Entre os constituintes da poluição do ar, as partículas (material particulado) parecem ser as mais nocivas à saúde humana (Krewski e Rainham, 2007).

Pouco se sabe sobre os efeitos da exposição aos poluentes atmosféricos e a fertilidade feminina em seu sentido mais amplo. A fertilidade feminina pode ser influenciada por uma série de fatores, entre eles, idade, deficiências na ovulação, obstrução das tubas uterina, endometriose, alterações hormonais, anormalidades uterinas (ex: decidualização imperfeita), estresse e estado nutricional comprometido (Homan et al., 2007). Alguns destes fatores são difíceis de serem controlados em estudos em humanos.

Estudos experimentais anteriores mostraram um aumento na ocorrência de falhas implantacionais e índices gestacionais diminuídos em fêmeas de camundongos expostas a poluição do ar (Mohallem et al., 2005; Veras et al., 2009). Estudos epidemiológicos que associam a exposição pré-gestacional a um declínio na fecundabilidade (Dejmek et al., 2000) e o risco aumentado de perdas gestacionais precoces (Perin et al., 2010) nos levaram a hipotetizar que a exposição materna pré-gestacional somada à exposição nos primeiros dias pós-concepção a poluição do ar compromete a receptividade uterina e, portanto a implantação embrionária e consequentemente a capacidade de levar uma gestação a termo.

1.1 Poluição atmosférica

1.1.1 Histórico

Desde a metade do século XX, a população tem passado a se preocupar com os efeitos negativos causados pela poluição atmosférica, principalmente nos centros urbanos, resultado das emissões veiculares. Não menos importantes são as emissões de indústrias e da queima de biomassa (Jacobson, 2002).

Os primeiros eventos que “abriram nossos olhos” para os males que a poluição do ar pode causar a nossa saúde ocorreram nas décadas de 30 a 50. Dentre os principais relatos destaca-se o nevoeiro que cobriu o Vale do Meuse, na Bélgica, em 1930, onde havia uma grande concentração de indústrias que utilizavam fornos de carvão e gasogênio¹ (Firket, 1936). Em um período de 5 dias, sob condições climáticas desfavoráveis, associadas a emissão de dióxido de enxofre (SO₂), muitas pessoas adoeceram e 63 pessoas morreram, principalmente idosos e portadoras de doenças cardíacas e respiratórias (Nemery et al., 2001).

Nos EUA fato semelhante ocorreu em uma pequena cidade chamada Donora localizada na Pensilvânia. Com uma grande quantidade de metalúrgicas, em 1948 ocorreu uma inversão térmica e um grande nevoeiro se formou sobre a cidade. Durante 6 dias estima-se que 40% do total de 14000 habitantes adoeceram, 400 pessoas foram hospitalizadas e 20 pessoas morreram. As vítimas apresentavam problemas cardiovasculares e respiratórios (Ciocco e Thompson, 1961; Helfand et al., 2001; Jacobson, 2002).

Porém, o pior evento ocorreu em Londres, em 1952, causado pelo crescimento incontrolado da queima de combustíveis fósseis pelas indústrias e no transporte. Pessoas portadoras de bronquite, broncopneumonia, doenças do coração e idosos foram os mais desfavorecidos. Cerca de 4000 pessoas morreram e um grande número de pessoas adoeceram.

¹ Gás obtido por meio da queima de carvão.

Devido a uma alteração climática, os moradores da cidade queimaram mais carvão para aquecer seus lares e isso, favoreceu o aumento da poluição que foi agravado por uma inversão térmica. Como o carvão utilizado era de baixa qualidade, formou-se então uma densa névoa de material particulado (MP) e dióxido de enxofre (SO₂) (Bell e Davis, 2001; Jacobson, 2002).

Em 1954, após o Ministério da Saúde de Londres ter relatado que houve um aumento na taxa de mortalidade devido à epidemia de gripe, Wilkins (1954), observou que este aumento poderia estar relacionado à poluição do ar e que as pessoas expostas ao nevoeiro em dezembro de 1952 se tornaram menos resistentes à doença.

Em resposta ao episódio ocorrido em Londres, foi criada pelo parlamento inglês uma lei que vigorou a partir de 1956, o *Clean Air Act*. Esta lei introduziu uma série de medidas com o objetivo de reduzir drasticamente a poluição do ar, especialmente em áreas de maior risco de ocorrência e acúmulo de fumaça preta emitida pelas chaminés das residências, incentivando a troca do sistema de aquecimento a carvão por energia elétrica ou a gás, a modificação da altura das chaminés, a utilização apenas de combustíveis menos poluidores e o deslocamento das indústrias para as áreas rurais (Vallero, 2008; Stanek et al., 2011).

Em 1970, foi criada a agência americana de proteção ambiental U.S.EPA - *United States Environmental Protection Agency* com o objetivo de consolidar em uma só agência uma variedade de atividades em pesquisa, monitoramento, fiscalização e execução de normas para assegurar a proteção ambiental. Coube então ao U.S.EPA, estabelecer os padrões nacionais de qualidade do ar, criando o *National Ambient Air Quality Standards* (NAAQS) que definiu os limites máximos para o dióxido de enxofre (SO₂), monóxido de carbono (CO), dióxido de nitrogênio (NO₂) e chumbo, incluindo o material particulado (MP₁₀ e MP_{2,5}) e o ozônio (O₃) (U.S.EPA, 2006; Bachmann, 2007).

1.1.2 Classificação, níveis recomendados e órgãos reguladores da poluição atmosférica

Toda substância, sob forma gasosa, líquida ou sólida presente no ar com características e concentrações acima dos níveis estabelecidos, que causem ameaça a saúde humana, à fauna, à flora, danos aos materiais e ao meio ambiente em geral é considerada pelo CONAMA (Conselho Nacional de Meio Ambiente) um poluente atmosférico.

Com relação a sua origem, os poluentes podem ser classificados como:

- Primários: aqueles emitidos diretamente pelas fontes de emissão;
- Secundários: aqueles formados na atmosfera por meio da reação química entre poluentes e/ou constituintes naturais na atmosfera.

A emissão de poluentes atmosféricos no ambiente tem sua origem veicular e industrial sendo intensificada ou não pelas condições meteorológicas, causa alterações nos parâmetros de CO, SO₂ e MP durante o inverno, desfavorecendo a dissipação dos poluentes. Quanto ao O₃ estas alterações podem ser mais aparentes durante o verão, pois este poluente depende da intensidade de luz solar para ser formado (CETESB, 2010).

Na região metropolitana de São Paulo, os problemas de qualidade do ar ocorrem principalmente em função dos poluentes provenientes dos veículos, motivo pelo qual se enfatiza a importância do controle das emissões veiculares. Os países industrializados são os maiores produtores de poluentes, enviando anualmente bilhões de toneladas para a atmosfera.

O Quadro 1 apresenta os principais poluentes encontrados na atmosfera, suas características e suas principais origens.

Quadro 1 - Principais poluentes indicadores da qualidade do ar, suas características e principais fontes. Fonte: CETESB, 2010.

Poluente	Características	Fontes Principais
Dióxido de enxofre (SO ₂)	Gás incolor, com forte odor.	Queima de óleo combustível, refinaria de petróleo, veículos a diesel, produção de polpa e papel, fertilizantes.
Dióxido de nitrogênio (NO ₂)	Gás marrom avermelhado, com odor forte e irritante.	Processos de combustão envolvendo veículos automotores, processos industriais, usinas térmicas que utilizam óleo ou gás, incinerações.
Monóxido de carbono (CO)	Gás incolor e inodoro.	Veículos automotores e indústrias.
Partículas inaláveis (MP ₁₀ e fumaça)	Partícula de material sólido ou líquido, menores que 10µm, que ficam suspensas no ar, na forma de poeira, fuligem etc.	Processos de combustão (indústria e veículos automotores), aerossol secundário (formado na atmosfera).
Partículas Totais em Suspensão (PTS)	Partículas de material sólido ou líquido que ficam suspensas no ar, na forma de poeira, neblina, aerossol, fumaça, fuligem, etc. Faixa de tamanho < 100µm.	Processos industriais, veículos motorizados (exaustão), poeira de rua ressuspensa, queima de biomassa. Fontes naturais: pólen, aerossol marinho e solo.
Ozônio (O ₃)	Gás incolor e inodoro.	É produzido fotoquimicamente pela radiação solar sobre os NO ₂ e compostos orgânicos voláteis.

No Brasil, o CONAMA estabeleceu os padrões de qualidade do ar por meio da Resolução Nº 03 de 28/06/1990, com base na Portaria Normativa Nº348 de 14/03/90 do IBAMA. Esta resolução estabelece padrões primários

e secundários da qualidade do ar, que se ultrapassados, podem afetar a saúde da população e causar danos à biota.

Para os efeitos desta resolução ficam estabelecidos os seguintes conceitos:

- padrão primário: são as concentrações de poluentes que, ultrapassadas poderão afetar a saúde da população; assim como o mínimo dano à fauna, à flora, aos materiais e ao meio ambiente em geral.

- padrão secundário: são as concentrações de poluentes abaixo das quais se prevê o mínimo efeito adverso sobre o bem-estar da população.

O Quadro 2 mostra os principais poluentes e seus níveis máximos de concentração permitidos no ar de acordo com o tempo de amostragem.

Quadro 2 - Principais poluentes do ar e níveis máximos de concentração permitidos no ar. Fonte: CETESB, 2010.

Poluente	Tempo de Amostragem	Padrão Primário ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Padrão Secundário ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)
Partículas Totais em Suspensão	24 horas	240	150
	Média Anual	80	60
Partículas inaláveis	24 horas	150	150
	Média Anual	50	50
Fumaça	24 horas	150	100
	Média Anual	60	40
Dióxido de enxofre	24 horas	365	100
	Média Anual	80	40
Dióxido de nitrogênio	1 hora	320	190
	Média Anual	100	100
Monóxido de Carbono		40.000	40.000
	1 hora	35 ppm	35 ppm
	8 horas	10.000	10.000
		9 ppm	9 ppm
Ozônio	1 hora	160	160

$\mu\text{g}/\text{m}^3$ = microgramas de poluente por m^3 de ar; ppm= partes por milhão ou seja, número de moléculas do poluente por um milhão de moléculas constituintes do ar.

Considerando a necessidade de se estabelecer estratégias para o controle, preservação e recuperação da qualidade do ar, o CONAMA criou dois programas nacionais para a qualidade do ar. São eles:

- PROCONVE - (Resolução 018/86 do CONAMA, de 06.05.1986) - Programa Nacional de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores, objetivando a redução de emissões.
- PRONAR - (Resolução 005/89 do CONAMA, de 15.07.1989) - Programa Nacional de Controle da Qualidade do Ar, cujo objetivo é contribuir para a gestão ambiental e o desenvolvimento socioeconômico do país, estabelecendo padrões de qualidade do ar e padrões de emissão.

Em março de 2008, durante uma reunião do Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA), foram pautadas questões sobre a necessidade de revisar os padrões de qualidade do ar na Região Metropolitana de São Paulo.

O CONSEMA estabeleceu um grupo de trabalho para organizar um seminário internacional sobre a poluição atmosférica com base nas novas recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2005). Participaram da organização do seminário especialistas da CETESB, da Secretaria de Estado da Saúde, da Faculdade de Medicina da USP e da bancada ambientalista do CONSEMA. Este grupo considerou as concentrações de poluentes medidas em dois anos meteorologicamente distintos, seguida por uma simulação do número de vezes em que as concentrações observadas excederiam valores predeterminados, sendo esses baseados nos valores intermediários propostos pela OMS, onde foram propostos novos padrões para os seguintes poluentes: fumaça, PTS, Pb, CO, SO₂, NO₂ e O₃. Para o MP₁₀ e MP_{2,5} propõem-se como meta final de 50 µg/m³ para 24h e 20 µg/m³ para concentração média anual e 25 µg/m³ para 24h e 10 µg/m³ para concentração média anual, respectivamente.

1.1.3 Material particulado

O material particulado (MP) é uma mistura complexa de partículas extremamente pequenas e gotículas líquidas que incluem ácidos, sulfatos, nitratos, metais, poeira, partículas do solo, bem como compostos orgânicos. As partículas classificam-se conforme o seu tamanho em fina ($MP_{2,5}$ com diâmetro aerodinâmico inferior a $2,5\mu m$), grossa ($MP_{2,5}$ - MP_{10} , com diâmetro aerodinâmico entre $2,5\mu m$ e $10\mu m$) e ultrafinas, menores que $0,1\mu m$ (100 nm) (CETESB, 2008; 2010).

O tamanho e a composição elementar do MP estão relacionados aos seus efeitos adversos sobre a saúde (Dreher et al., 1997; Glorennec e Monroux, 2007). A poluição particulada de origem antropogênica (queima de combustíveis fósseis e matéria orgânica) contém material biológico, compostos orgânicos, hidrocarbonetos, aerossóis ácidos e metais aderidos a um núcleo carbonáceo. A densidade de tráfego veicular é um dos principais determinantes da concentração ambiental de MP em áreas urbanas (Fernvik et al., 2002; Brook et al., 2007; Bedeschi et al., 2007; Yang et al., 2008).

De uma maneira geral, as menores frações estão associadas a maior incidência de efeitos adversos (Zhou e Ye, 1997; Ueng et al., 2004; Gu et al., 2005). A maior toxicidade é atribuída ao fato de que esta fração é capaz de atingir as regiões mais distais do sistema respiratório e mesmo atravessar a barreira alveolar chegando à corrente sanguínea (Kampa e Castanas, 2008). Além disto, soma-se o fato de conter maiores concentrações de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), semiquinonas², metais pesados e metais de transição e possuem uma maior capacidade de gerar radicais livres (Squadrito et al., 2001; de Kok et al., 2006; Hogervorst et al., 2006).

No Brasil, ainda não existe uma legislação vigente padrão para $MP_{2,5}$. A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2005) definiu uma concentração anual média de $10\mu g/m^3$ e de $25\mu g/m^3$ para 24 horas de exposição. Nos

² Quinonas são compostos orgânicos que são derivados de compostos aromáticos, tais como o benzeno, pela conversão de um número de $-CH=$ em $-C=$.

Estados Unidos, as médias anuais não podem ultrapassar $15\mu\text{g}/\text{m}^3$ e $35\mu\text{g}/\text{m}^3$ para 24 horas (U.S.EPA, 2007). A União Européia estabeleceu, em 2008, $25\mu\text{g}/\text{m}^3$, a ser atendido em 2010, com base na concentração média dos anos 2008, 2009 e 2010.

1.2 Evidências epidemiológicas e experimentais sobre os efeitos adversos da exposição à poluição do ar sobre a gestação e sobre o sistema reprodutor feminino

1.2.1 Estudos epidemiológicos

Os estudos epidemiológicos indicam que mulheres gestantes expostas aos níveis ambientais de MP tem maior risco de ter o desenvolvimento de sua gestação comprometido (Wang et al., 1997; Dejmek et al., 1999; Ha et al., 2001; Srám et al., 2005; Ritz et al., 2007). Apesar das diferenças no “*design*” dos estudos e métodos estatísticos empregados, bem como a presença de muitos fatores de confusão, tais como, o fumo, idade gestacional, *status* econômico, social e nutricional, estas investigações sugerem uma associação causal entre a exposição e alteração do desenvolvimento fetal.

Estes estudos mostram principalmente a associação da exposição com baixo peso ao nascer, prematuridade, malformações congênitas e mortalidade neonatal (Xu et al., 1995; Bobak, 2000; Ritz et al., 2000; 2007; Ha et al., 2001; Maisonet et al., 2001; Parker et al., 2005). Além dos efeitos negativos sobre a gestação, são observados efeitos sobre outras funções reprodutivas incluindo alterações na fertilidade feminina, tais como, puberdade e menopausa precoce; e alterações na fertilidade masculina, como a redução na motilidade e alterações na morfologia dos espermatozoides (Sharara et al., 1998; Dejmek et al., 2000; Selevan et al., 2000; Slama et al., 2008; Perin et al., 2010).

Mortalidade neonatal: Mulheres que foram expostas durante a gestação, às concentrações acima ou mesmo dentro dos níveis aceitáveis

de MP_{10} ($<10\mu m$) e SO_2 , resultaram em índices elevados de mortalidade neonatal (0 a 27 dias de vida) e pós-neonatal (28 a 365 dias de idade), principalmente por causas respiratórias (Bobak e Leon, 1999; Lacasaña et al., 2005). Por exemplo, o estudo de Kaiser et al. (2004), no qual avaliaram o risco de mortalidade neonatal associado a exposição a MP_{10} em 23 áreas metropolitanas dos EUA, mostrou que concentrações maiores de $12\mu g/m^3$ de MP_{10} estavam correlacionadas ao aumento na incidência de mortes pós-neonatais. Em São Paulo, dois estudos avaliaram esta associação e encontraram que a mortalidade intrauterina e neonatal estava associada a concentrações diárias elevadas de NO_2 , MP_{10} e SO_2 (Pereira et al., 1998; Lin et al., 2004).

Uma pesquisa realizada em Flanders, Bélgica, associou o MP_{10} ao aumento de 11% na mortalidade entre recém-nascidos entre 8 a 28 dias de idade. Também foi observado que nos dias em que a concentração média de MP_{10} ultrapassava os limites estabelecidos pela União Europeia ($50\mu g/m^3$), o número de mortes neonatais aumentava (Scheers et al., 2011).

Baixo peso ao nascer (BPN): O baixo peso ao nascer ($< 2500g$) é o efeito mais associado à exposição à poluição do ar, o que reflete uma restrição do crescimento fetal (van den Hooven et al., 2012; Wilhelm et al., 2012). O peso ao nascer é um importante indicador da saúde, crianças que nasceram com baixo peso estão mais predispostas a desenvolver hipertensão, problemas coronarianos e diabetes tipo 2 (Osmond e Barker, 2000).

Estudos conduzidos na China (Wang et al., 1997), República Tcheca (Dejmek et al., 1999), e EUA (Ritz et al., 1999) indicam que níveis elevados de SO_2 e MP estão correlacionados a riscos aumentados de BPN. Porém outros poluentes também são citados na literatura, tais como CO e NO_2 (Ha et al., 2001).

Um estudo conduzido em São Paulo encontrou uma associação entre a exposição maternal ao MP_{10} e CO durante o 1º trimestre da gestação e redução do peso ao nascer (Gouveia et al., 2004). Em Sydney, Austrália,

Mannes et al. (2005) mostraram que há uma redução de 4 g (95% CI, 3 - 6) no peso ao nascer para cada $1\mu\text{g}/\text{m}^3$ de aumento nos níveis de MP. Bell et al. (2010) observaram que altos níveis $\text{MP}_{2,5}$ e zinco estão associados ao BPN e ao aumento no risco da criança nascer com BPN em regiões com alto tráfego veicular.

Estudos recentemente realizados na Pensilvânia, Estados Unidos, também observaram que a exposição ao MP_{10} durante o 1º trimestre da gestação está associada ao baixo peso em recém-nascidos à termo (Xu et al., 2011). Do mesmo modo, a exposição aos HPAs aumenta a prevalência de bebês pequenos para a idade gestacional (Vassilev et al., 2001).

Partos prematuros: A ocorrência de partos prematuros tem apresentado uma tendência de aumento na prevalência mundial nas últimas décadas (WHO, 2012). Aumentos nos riscos de partos prematuros (nascimento antes da 37ª semana gestacional) também estão associados à exposição materna à poluição do ar. A maioria dos estudos que correlacionam parto prematuro e poluição do ar têm sido limitados a comunidades urbanas com alta densidade populacional e altos níveis de poluição do ar (Xu et al., 1995; Ritz et al., 2007; Darrow et al., 2009).

Durante a última década foi observado um crescimento dos estudos sobre a exposição pré-natal aos poluentes e o parto prematuro. Contudo, vários autores concluem que os dados encontrados ainda são limitados e contraditórios, devidos fatores de interferência como, idade materna, etnia, cuidados pré-natais, nível de escolaridade materna, condições climáticas locais, estado civil, o sexo da criança, idade gestacional, risco gestacional e o tempo da exposição ao poluente (Xu et al., 1995; Bobak, 2000; Sagiv et al., 2005; Hansen et al., 2006; Ritz et al., 2007).

Um estudo realizado por Xu et al. (1995) mostra que há uma redução na duração da gestação de 0.075 (12,6 horas) semanas e 0.042 (7,1 horas) semanas para cada aumento de $100\mu\text{g}/\text{m}^3$ no SO_2 e das partículas totais em suspensão, respectivamente. Um estudo conduzido por Mohorovic (2004) confirmou os efeitos adversos da exposição ao SO_2 nos meses iniciais da

gestação. Seu estudo mostra que a exposição nos dois primeiros meses da gestação resulta em gestações mais curtas e massa corporal reduzida do recém-nato.

Ritz et al. (2000) observaram que a exposição a níveis ambientais elevados de MP_{10} durante o primeiro trimestre da gestação e nas últimas seis semanas antes do nascimento da criança contribuem para aumentos na ocorrência de partos prematuros no sul da Califórnia. Sagiv et al. (2005) analisaram gestantes expostas ao MP_{10} ao SO_2 em quatro municípios da Pensilvânia, EUA. Neste estudo foi observada uma associação entre a exposição aos poluentes com o aumento no risco de partos prematuros (SO_2 : RR= 1,15; 95% CI, 1,00-1,32 para um aumento de 1,15ppb e MP_{10} : RR= 1,07; 95% CI, 0,98-1,18 para um aumento de $50\mu g/m^3$).

Os resultados obtidos em um estudo realizado em Brisbane, Austrália, também mostraram que a exposição ambiental materna no primeiro trimestre da gestação ao MP_{10} e ao O_3 aumentou o número de partos prematuros no período de 2000 a 2003 (Hansen et al., 2006).

Diversos estudos realizados na Califórnia, observaram que as exposições maternas ao $MP_{2,5}$ e CO no primeiro trimestre, nas duas últimas semanas e durante toda a gestação estão associadas ao parto prematuro (Huynh et al., 2006; Ritz et al., 2007; Wilhelm et al., 2011).

Alterações da capacidade reprodutiva: Poucos estudos avaliaram os efeitos da exposição à poluição do ar sobre a fertilidade humana. Porém, os estudos conduzidos relatam que a exposição crônica está associada a um decréscimo na fertilidade (Dejmek et al., 2000, Selevan et al., 2000; Hammoud et al., 2010). Estudos conduzidos em Teplice República Tcheca, Salt Lake City e Carolina do Norte, Estados Unidos mostraram que homens expostos a períodos de elevada poluição apresentaram alterações em diferentes parâmetros seminais, tais como, motilidade, morfologia e fragmentação do DNA dos espermatozoides (Selevan et al., 2000; Rubes et al., 2005; Hansen et al., 2010; Hammoud et al., 2010).

Quando a exposição parental ocorre antes da concepção, os efeitos negativos sobre os desfechos gestacionais não estão excluídos. A exposição paterna e materna prévia à concepção podem comprometer os desfechos gestacionais por uma desregulação hormonal ou por provocar danos diretos aos gametas e órgãos reprodutores (Hood, 2006). Estudos experimentais e outros conduzidos em humanos mostram que muitos dos compostos presentes na poluição do ar, tais como metais pesados (Pb, Cd), estrógenos ambientais, partículas de diesel e dos HPA são capazes de suprimir ou interferir na regulação do eixo hipotalâmico hipofisiário gonadal e consequentemente afetar todo o processo gestacional, incluindo a sinalização do conceito com o útero e a preparação do útero para a implantação (Mattison e Thomford, 1989; Hoyer e Sipes, 1996; Tsukue et al., 2001; Takeda et al., 2004; Telisman et al., 2007).

1.2.2 Evidências experimentais

Para melhor entendermos os potenciais efeitos adversos da exposição à poluição do ar sobre a capacidade reprodutiva e verificarmos se os achados experimentais podem corroborar com os achados epidemiológicos, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um modelo experimental de exposição em multi-geração (camundongos Balb/c) ao material particulado em condições ambientais reais (Mohallem et al., 2005; Veras et al., 2008; 2009). A ideia deste modelo foi criar um gradiente nos níveis ambientais de MP pela filtração do ar. As exposições foram conduzidas em duas câmaras de topo aberto, uma recebendo ar filtrado e a outra o ar ambiente (Mohallem et al., 2005). Utilizando estas câmaras demonstramos que os mesmo níveis ambientais moderados (média diária $MP_{2,5} = 28\mu g/m^3$) podem comprometer a saúde reprodutiva nos camundongos.

Notamos uma redução no número de fetos viáveis, um aumento no número de falhas implantacionais e um decréscimo na razão sexual de machos e fêmeas (Mohallem et al., 2005; Lichtenfels et al., 2007; Rocha e Silva, 2008). Recentemente Veras et al. (2008; 2009) demonstraram que a

exposição crônica por várias gerações resulta em outros desfechos negativos no processo reprodutivo. Na segunda geração foi observado que a exposição gestacional resulta em um comprometimento do desenvolvimento fetal, evidenciado pelo baixo peso ao nascer. Uma redução média de 21% no peso foi observada em camundongos expostos a poluição particulada.

Embora cada vez mais seja reconhecida a associação entre a exposição à poluição e prejuízos no desenvolvimento fetal, a maior parte dos estudos avaliou somente a exposição que ocorre no período gestacional. Nosso modelo de exposição nos permitiu demonstrar que não só a exposição materna durante a gestação, mas também a exposição pré-gestacional afetam negativamente o desenvolvimento fetal. A exposição à poluição do ar no período gestacional, não afetou somente o peso ao nascer, mas também mostrou que a exposição neste período está associada a um aumento nos índices de perdas implantacionais (Veras et al., 2008; 2009).

Além disto, foi mostrado que a exposição interfere na ciclicidade estral³, diminui o número de folículos antrais, aumenta significativamente o tempo necessário para que o acasalamento ocorra e reduz os índices de fertilidade do casal e os índices gestacionais (Veras et al., 2008; 2009). Veras et al. (2008) relatam ainda que o desenvolvimento placentário é comprometido pela exposição a poluição do ar, que pode representar um dos mecanismos envolvidos no comprometimento do desenvolvimento fetal. Até onde sabemos este foi o primeiro estudo a mostrar alterações placentárias provocadas pela exposição materna à poluição do ar.

Uma série de mecanismos já foi proposta para explicar o comprometimento do ganho de peso fetal secundário a exposição à poluição do ar. Sugere-se que o MP inalado induz inflamação pulmonar e placentária, estresse oxidativo sistêmico, aumentos na pressão arterial materna, alteração na coagulabilidade sanguínea, resultando em um desenvolvimento placentário inadequado com consequente prejuízo na transferência de

³ Ciclo estral: alterações fisiológicas e comportamentais cíclicas induzidas por hormônios esteroides em fêmeas de mamíferos não-primatas. O ciclo estral se inicia após a puberdade. Corresponde ao ciclo menstrual em humanos.

nutrientes e oxigênio para o feto (Kannan et al., 2007). Todos os mecanismos propostos são plausíveis para explicar o baixo peso ao nascer, porém não explicam totalmente os demais desfechos tais como as perdas implantacionais e alterações no ciclo estral. Talvez pela dificuldade de avaliar estes desfechos em humanos (alterações no ciclo menstrual e perdas gestacionais precoces) pouco se conhece sobre estes processos.

O que sabemos com base nos estudos epidemiológicos conduzidos em humanos é que a exposição à poluição do ar afeta os índices de fertilidade e a qualidade do sêmen. Mas em nossos estudos, nos quais apenas as fêmeas foram expostas, estes efeitos são observados. Então qual será a razão para estes desfechos? Alterações no embrião pré-implantação? Alterações na ovulação? Ou falha no desenvolvimento de um endométrio receptivo?

1.3 Prováveis pontos de vulnerabilidade tóxica envolvidos nas perdas implantacionais

O processo de implantação embrionária nos mamíferos envolve uma série de eventos inter-relacionados, os quais precisam ser completados com sucesso para que uma gestação normal ocorra. Primeiramente é necessário que o endométrio esteja preparado, nesta etapa o útero se capacita para a implantação, ou seja, torna-se receptivo a ela⁴ (de Feo, 1967). Ao mesmo tempo em que o útero se prepara (diferencia) ocorre o transporte do conceito pelo oviduto/tuba uterina. Os tempos destes fenômenos devem ser sincrônicos de maneira que o conceito ao chegar ao útero esteja no estágio de desenvolvimento apropriado (blastocisto) e o útero receptivo a ele (Itskovitz e Hodgen, 1988).

Neste curto intervalo de tempo, entre a concepção e a chegada do blastocisto ao útero (4 dias em camundongos e 6 em humanos) diversas etapas deste processo podem ser consideradas pontos de vulnerabilidade e

⁴ O endométrio humano é receptivo a implantação do blastocisto por apenas 4-5 dias em cada ciclo menstrual.

portanto afetadas pela exposição materna aos poluentes atmosféricos e, consequentemente prejudicar a implantação (Cummings, 1990).

Os processos que ocorrem no útero e são vulneráveis incluem a preparação do endométrio para a implantação, a implantação em si e a manutenção da gestação (Cummings, 1990). Entretanto, toxicantes também podem afetar o oviduto e, portanto a fertilização e o transporte do embrião. As funções ovarianas susceptíveis a toxicidade incluem a ovulação, bem como a síntese de hormônios esteroides e o desenvolvimento e função do corpo lúteo, como a produção da progesterona, importante para o crescimento, a vascularização, e o desenvolvimento do epitélio endometrial em preparação para implantação. (Rao e Gibori, 1987; Miller et al., 2004).

Efeitos tóxicos ao nível do sistema nervoso central também podem interferir na adequada interação entre o eixo hipotalâmico hipofisiário gonadal, afetando os níveis sistêmicos hormonais necessários para o processo reprodutivo (Miller et al., 2004). Muitos aspectos do sistema endócrino também são vulneráveis à ação de substâncias tóxicas, pois uma série de hormônios é necessária para que a gestação ocorra, hormônios ovarianos, gonadotrofinas hipofisárias, prostaglandinas uterinas, entre outros (Cummings, 1990).

A viabilidade do embrião bem como a função reprodutiva masculina também são aspectos obviamente susceptíveis a toxicidade, e podem comprometer o processo de implantação e a gestação, mas não foram abordados neste estudo (Dejmek et al., 2000; Hauser e Sokol, 2008).

1.4 Ciclo menstrual em humanos e remodelamento endometrial

As variações nos níveis dos hormônios ovarianos (progesterona e estrógeno, e em menor escala andrógenos) têm um papel significativo no controle dos processos de remodelamento endometrial em humanos.

Entretanto, diversas outras moléculas, localmente produzidas também garantem um microambiente que direciona o processo de proliferação, diferenciação, descolamento e reparação endometrial a cada ciclo. O

propósito desta ciclicidade é prover a cada ciclo um ambiente que é condizente com a implantação do blastocisto. O útero é revestido por uma mucosa complexa, composta por dois compartimentos distintos a camada basal (germinativa) que persiste em todas as fases do ciclo e a camada funcional, mais superficial e transitória. A função principal desta camada é acomodar o blastocisto e prover o componente materno da placenta (Padykula et al., 1989). Ela é constituída por um epitélio luminal e glândulas associadas a ele incluídas em um estroma de tecido conjuntivo, que inclui uma elaborada árvore vascular. As características histológicas cíclicas da estrutura do endométrio são bem conhecidas e descritas e coincidem com as alterações cíclicas que ocorrem nos ovários. A Figura 1 apresenta as variações hormonais durante o ciclo ovariano e sua correlação com as alterações estruturais endometriais durante o ciclo menstrual em humanos.

Figura 1 - Ciclo ovariano e menstrual em humanos (adaptado de Walmer et al., 1992).

As alterações endometriais, em humanos, são dirigidas pelos hormônios ovarianos, que atuam primariamente ligando-se a receptores hormonais específicos, que por sua vez agem como fatores de transcrição e modulam a expressão dos genes envolvidos no processo de remodelamento e preparação endometrial para a implantação embrionária.

Em humanos o ciclo menstrual padrão dura 28 dias e o ciclo endometrial pode ser classificado em 3 fases: fase proliferativa, secretória e menstrual. A fase proliferativa, subsequente à menstruação é caracterizada

pela re-epitelização e crescimento do estroma e dos elementos glandulares. Nesta fase do ciclo o estrógeno é o hormônio predominante, que por sua vez é dependente do hormônio folículo estimulante (FSH). Histologicamente o endométrio nesta fase é caracterizado por glândulas retas pouco diferenciadas e que em corte transversal apresentam-se circulares, revestidas por um epitélio colunar e o estroma contém células alongadas com núcleos grandes. Na fase proliferativa intermediária as glândulas passam a apresentar uma ligeira tortuosidade e seu epitélio torna-se pseudoestratificado; figuras mitóticas no epitélio glandular são proeminentes. Já no final da fase proliferativa as glândulas se apresentam tortuosas e com lúmen amplo e há um ligeiro edema no estroma (Salamonsen e Jones, 2003). O estroma é constituído por fibroblastos não diferenciados com características mesenquimais. Estas células estromais estão envolvidas nas atividades de remodelamento da matriz extracelular ao longo do ciclo (Salamonsen e Jones, 2003). Na fase secretória, a elevação rápida nos níveis de progesterona produzem mudanças significativas no endométrio, as mais óbvias ocorrem nas glândulas endometriais que se tornam extremamente diferenciadas, com intensa atividade de síntese e secreção (Dockery e Rogers, 1989; Dockery et al., 1988). Nesta fase a pseudoestratificação desaparece e as células se tornam mais colunares. No auge desta fase as glândulas apresentam-se extremamente tortuosas. Enquanto isso o estroma começa a sofrer mudanças pré-decduais (as células do estroma nas regiões perivasculares se tornam maiores, edema, infiltração linfocitária) [Salamonsen e Jones, 2003; Dockery et al., 1990]. Também a superfície das células não ciliadas respondem as variações hormonais (Johannisson e Nilsson, 1972). Na fase secretória a quantidade de microvilos diminui e protusões apicais nas células não ciliadas se tornam mais proeminentes, estas estruturas são conhecidas como pinopódios e parecem estar envolvidas com a modulação do ambiente uterino para a implantação (Martel et al., 1991; Nikas et al., 1995; Nikas, 1999). Caso a implantação não ocorra toda a camada funcional sofrerá mudanças involutórias que culminam com sua remoção (menstruação).

1.5 Ciclo estral em camundongos e remodelamento endometrial

Similaridades entre os roedores e os seres humanos são observadas tanto nas variações dos níveis dos hormônios ovarianos e controle no processo do remodelamento endometrial, com exceção que em camundongos, a camada funcional só é renovada após o parto.

O camundongo apresenta ciclos estrais espontâneos de 4-5 dias (variável de acordo com a espécie), dividido em 4 fases (proestro, estro, metaestro e diestro). O proestro é a fase em que ocorre um aumento nos níveis do hormônio luteinizante (LH) que irá preceder a ovulação; ao ovular a fêmea entra em estro e torna-se receptiva ao macho. Caso a cópula não ocorra, os níveis decrescentes de estrógeno levarão a regressão do endométrio e degeneração do epitélio, sem ocorrência de sangramentos. O diestro é a fase de regeneração do endométrio. Nestes animais o ciclo é dominado pelo estradiol-17 não há uma fase luteal de verdade, dado que pouquíssima progesterona é sintetizada a não ser que a cópula ocorra (Guttenberg, 1961; Walmer et al., 1992). Somente uma pequena quantidade de progesterona é sintetizada antes da ovulação e a maior parte do que é sintetizado é convertida em um metabolito inativo (20-hidroxiprogesterona). Porém esta pequena quantidade é necessária para que o hipotálamo secrete LH que induzirá a ovulação, sincronizando a fertilização com a preparação uterina para a implantação. Se a cópula ocorrer, o corpo lúteo se mantém e a síntese de progesterona continua, causando a diferenciação do endométrio para a implantação. Resumidamente, o estrógeno produzido durante o proestro estimula a proliferação das células do epitélio luminal e glandular (Finn e Martin, 1969). Logo os níveis de estrógeno começam a cair e chegam ao nível mínimo no metaestro, quando uma ligeira proliferação celular ocorre no estroma. Se o coito ocorrer, a partir do 2º dia após a cópula há uma nova onda de proliferação celular no epitélio luminal e glandular dependentes dos níveis de estrógeno. Com a síntese de progesterona pelo recém formado corpo lúteo, esta proliferação nos epitélios é bloqueada e as células se diferenciam para uma forma receptiva ao blastocisto. Também a

progesterona irá estimular a proliferação das células do estroma e prepará-las para um novo aumento nos níveis de estrógeno que ocorre logo antes da implantação (Finn e Martin, 1969). Este aumento é imprescindível para a implantação, dela depende a indução da reposta decidual (Moulton e Koenig, 1984). Nos camundongos a implantação ocorre no pólo antimesometrial⁵.

A Figura 2 mostra as variações hormonais durante o ciclo estral em camundongo.

Figura 2 - Variações nos níveis de progesterona e estrógeno durante o ciclo estral em camundongos (adaptado de Walmer et al., 1992).

1.6 Implantação embrionária e receptividade uterina

A implantação do blastocisto é uma característica única da reprodução nos mamíferos e trata-se de um processo finamente regulado. Alterações nos níveis de hormônios esteroides ovarianos durante o período pré-implantacional estimulam a maturação do epitélio e estroma endometrial. Após a influência estrogênica pré-ovulatória, aumentos na produção de progesterona ovariana sensibilizam o útero para a implantação. Nos roedores a habilidade do útero de suportar e facilitar a implantação do blastocisto é regulada por mais um aumento transitório nos níveis de estrógeno (Finn e Martin, 1970). O estrógeno induz alterações que permitem ao útero suportar a implantação do blastocisto por um curto período de tempo, denominado janela implantacional ou período receptivo. Nos

⁵ Pólo antimesometrial: ver fig. 8.

roedores este período dura 18-24hs e nos humanos alguns dias (Navot et al., 1991). A resposta endometrial receptiva envolve a diferenciação do epitélio endometrial e do estroma para um fenótipo que favorece a interação com a trofotoderme do blastocisto. As mudanças no epitélio luminal com a qual o blastocisto irá interagir e se fixar são essenciais para o início da implantação (Kimber e Spanswick 2000, Aplin e Kimber 2004).

A implantação embrionária representa uma das etapas mais críticas durante o processo reprodutivo, na qual o blastocisto ao interagir com o endométrio irá formar a interface (placenta) de comunicação entre o conceito em desenvolvimento e o organismo materno (Denker, 1993; Aplin, 2000). Este processo envolve um diálogo complexo mediado por fatores de crescimento, hormônios, moléculas de adesão, componentes da matriz extracelular, prostaglandinas entre outros (Lessey et al., 1992; Simon et al., 2000). Estima-se que a receptividade uterina inadequada é responsável por 2/3 das falhas implantacionais, enquanto problemas relacionados ao embrião sejam responsáveis por 1/3 (Simon et al., 1998; Lédée-Bataille et al., 2002).

Resumidamente o processo de implantação pode ser dividido em 3 estágios: aposição, adesão e invasão. Durante a aposição, as células trofoblásticas do blastocisto se posicionam próximo ao epitélio luminal. Durante o processo de adesão, o blastocisto se fixará ao epitélio luminal. Logo, o blastocisto invade a lâmina basal do epitélio e a matriz extracelular do estroma do endométrio receptivo. A partir deste momento, o embrião não pode mais ser deslocado e começa o processo de penetração invasiva do blastocisto através do tecido endometrial (Dey et al., 2004).

Entretanto durante a maior parte do ciclo, o endométrio representa uma barreira à implantação embrionária. Somente durante um curto período e sob condições hormonais apropriadas ele se torna receptivo. Em humanos este período corresponde a 6-10º dia pós-ovulação e nos camundongos 4-5º dia pós-coito.

O conceito de receptividade endometrial surgiu a partir de estudos de transferência embrionária, nos quais foi observado que somente os embriões

transferidos para fêmeas sincrônicas implantaram. Se o endométrio materno e o embrião transferido estiverem em fases diferentes, a implantação não ocorria (Swiersz e Giudice, 1997; Carson et al., 2000; Sharkey e Smith, 2003).

A Figura 3 mostra uma representação da aposição do blastocisto no estágio pré-implantacional e as principais vias de sinalização necessárias para que ocorra a receptividade uterina.

Figura 3 – Representação da aposição do blastocisto. Vias de sinalização dos principais fatores envolvidos na receptividade uterina. LIF – Fator inibidor de leucemia; IL-1- Interleucina-1; IL-6 – Interleucina 6 (adaptado de Norwitz et al., 2001).

1.7 Fatores envolvidos na receptividade uterina, comuns aos humanos e camundongos

Entre os fatores envolvidos na receptividade uterina, destacamos quatro, comuns aos humanos e camundongos:

- presença de pinopódios;
- expressão de mucinas;
- expressão de LIF;
- expressão de IL-1 e IL-6.

1.7.1 Pinopódios

Pinopódios são estruturas em forma de balão que se projetam na superfície apical das células epiteliais luminais do endométrio em camundongos, ratos e humanos durante o período receptivo (Nilsson, 1958; Johannisson e Nilsson, 1972; Enders e Nelson, 1973; Singh et al., 1996). No endométrio do rato, a aparição dos pinopódios certamente marca o período de receptividade com um aumento significativo destas estruturas no 4º-5º dia de gestação (Psychoyos e Mandon, 1971) e por volta do 6º dia há um rápido declínio (Singh et al., 1996; Quinn et al., 2007b). Diversos estudos conduzidos em humanos e roedores dão suporte ao uso dos pinopódios como um marcador de receptividade uterina (Nikas et al., 1995, 2000; Nikas e Psychoyos, 1997).

Geralmente forma-se um pinopódio por célula, cobrindo a maior porção de sua superfície (Psychoyos e Mandon, 1971; Develioglu et al., 2000; Nikas et al., 2000; Quinn et al., 2007b). Diferenças existem entre a morfologia dos pinopódios entre as espécies. No rato os pinopódios contêm um ou dois vacúolos, nenhuma organela e se projetam a partir de um pedúnculo na superfície apical da célula acima do nível dos microvilos (Warren e Enders, 1964; Nilsson, 1966, 1972; Enders e Nelson, 1973; Parr e Parr, 1974; Lopata et al., 2002). Nos humanos os pinopódios se estendem diretamente a partir da superfície apical, cobrindo-a; eles possuem organelas e não apresentam

vacúolos (Friedrich, 1967; Murphy, 2000; Bentin-Ley e Lopata, 2000). Nos camundongos e nos humanos estes pinopódios apresentam superfície lisa durante o período de receptividade, enquanto nos ratos os pinopódios são moderadamente pregueados [Figura 4] (Enders e Nelson, 1973; Nikas et al., 1995, 2000; Quinn et al., 2007b). Em média os pinopódios possuem diâmetro de 3-4 μ m (Ljungkvist e Nilsson, 1971; Enders e Nelson, 1973) nos ratos, de 6 μ m nos camundongos e humanos (Quinn et al., 2007b; Acosta et al., 2000; Nikas et al., 2000; Quinn et al., 2007a). Já a porcentagem do epitélio recoberta por pinopódios durante o período de receptividade varia muito entre os estudos: entre 5,5%-20% em ratos, e 0,6% - 20% em camundongos (Nilsson, 1972; Parr e Parr, 1974,1977; Nikas et al., 2000; Quinn et al., 2007a; Quinn et al., 2007b).

Figura 4 - Eletromicrografia de varredura da superfície apical do epitélio luminal endometrial em humano (a), camundongo (b) e rato (c) durante seu estado receptivo evidenciando os pinopódios (Quinn e Casper, 2009).

Ainda não se sabe ao certo a função dos pinopódios para a receptividade uterina, acredita-se que eles facilitem a fixação do blastocisto, ou que auxiliem no fechamento uterino (aposição das paredes uterinas opostas que garantem que o embrião em implantação mantenha-se seguro) induzido pela pinocitose do fluido uterino (Enders e Nelson, 1973; Parr e Parr, 1974, 1977; Bentin-Ley e Lopata, 2000). Uma outra função possível dos pinopódios é a liberação de vesículas de LIF (fator inibidor de leucemia) no lúmen uterino (Kabir-Salmani et al., 2005). A formação dos pinopódios em humanos e roedores é dependente de progesterona (Ljungkvist, 1971;

Singh et al., 1996), enquanto o estrógeno resulta em seu rápido desaparecimento (Martel et al., 1991).

1.7.2 Fator inibidor de leucemia (LIF)

Durante a preparação para a implantação, o tecido uterino sofre ciclos distintos de proliferação e diferenciação celular. Estes ciclos são induzidos por hormônios esteroides ovarianos [estrógeno e progesterona] (Finn e Martin, 1969; Martin e Finn, 1970; Das e Martin, 1973). Algumas destas alterações são mediadas diretamente pela ação dos hormônios ou indiretamente pela indução de fatores de crescimento (EGF) e citocinas (IGF-1) produzidos localmente (Ignar-Trowbridge et al., 1992; Curtis et al., 1996; Adesanya et al., 1999; Hana e Murphy, 1994). Juntamente com estas alterações o útero muda sua receptividade; em camundongos o blastocisto não pode implantar durante os 3 primeiros dias após a cópula (Psychoyos, 1986). No final do 4º dia (e durante aproximadamente 18hs) o útero se torna receptivo. A implantação é estimulada por uma elevação transitória nos níveis de estrógeno (aumento nidatório) no início do 4º dia de gestação (DG). Um dos fatores essenciais para que a implantação se concretize é a expressão do LIF no epitélio glandular (Stewart et al., 1992; Filant e Spancer, 2013).

O LIF é uma glicoproteína altamente glicosilada, membro da família de interleucina 6 e apresenta uma série de funções biológicas (Haines, 2000). Assim como nos camundongos, LIF provavelmente exerce uma função regulatória no endométrio humano (Vogiagis et al., 1996, Hambartsoumian, 1998; Lass et al., 2001). Em humanos a expressão de LIF no útero também é aumentada durante o início da implantação (Cullinan et al., 1996; Hirzel et al., 1999; Vogiagis e Salamonsen, 1999). Em fêmeas de camundongo (C57Bl) *knockout* para o gene LIF, os embriões se desenvolvem, porém a implantação não ocorre (Stewart et al. 1992, Cheng et al., 2002) e o útero apresenta pouquíssimas evidências de decidualização (Chen et al., 2000).

Em humanos a proteína LIF e o mRNA do LIF são expressos nas glândulas endometriais na fase luteal do ciclo menstrual quando a implantação está prestes a ocorrer (Charnock-Jones et al., 1994; Arici et al., 1995; Chen et al., 1995). Nos camundongos, a maior expressão de LIF é encontrada no epitélio glandular logo após o aumento nos níveis de estrógeno nidatório na manhã do 4ºDG (Bhatt et al. 1991; Chen et al. 2000), entretanto alguma expressão também pode ser evidenciada no estroma endometrial (Yang et al., 1995; Fouladi-Nashta et al., 2004).

Os pinopódios não se desenvolvem na membrana apical das células epiteliais endometriais em fêmeas *knockout* para o gene LIF; nestes animais, a superfície celular permanece recoberta por microvilos (Fouladi-Nashta et al., 2005). Sugere-se que a implantação não ocorra em animais *knockout* para LIF pela não maturação apical das células endometriais e não formação dos pinopódios (Cheng et al., 2002).

1.7.3 Mucinas (Muc-1)

A superfície epitelial endometrial é recoberta por uma camada protetiva chamada glicocalix, composta por complexas moléculas glicosiladas que tem sua composição alterada durante as diferentes fases do ciclo estral. Um dos componentes deste glicocalix tanto em humanos quanto em camundongos são as mucina. As mucinas estão presentes em diversas superfícies mucosas e garantem resistência a ação de enzimas e previnem a adesão célula-célula ou célula-matriz extracelular (Hilkens et al., 1992; wesseling et al., 1996). As mucinas uterinas são reguladas hormonalmente (Hey et al., 1994) e sua expressão no estágio pré-receptivo justifica-se para evitar que o blastocisto se fixe enquanto está migrando no espaço uterino; durante o estado receptivo a concentração de mucinas diminui (Meseguer et al., 2001; Surveyor et al., 1995). Outras moléculas de adesão/antiadesão presentes na superfície epitelial do endométrio que alteram o estado de receptividade incluem uma série de glicoconjugados, trofinas, caderinas e integrinas (Thie et al., 1995; Kimber e Spanswick, 2000; Aoki et al., 2000).

1.7.4 Interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6)

Existem evidências que a Interleucina-1 (IL-1) e a Interleucina-6 (IL-6) têm um importante papel na regulação endometrial durante a implantação humana (Tovey et al., 1988; Tabibzadeh et al., 1995; Simon et al., 1997). Para que a implantação seja bem sucedida é necessária a interação entre o blastocisto e o endométrio, e esta interação é feita parcialmente por meio de citocinas parácrinas (Wegmann, 1991). No endométrio humano, o sistema IL-1 é composto por IL-1 α e IL-1 β , um receptor antagonista IL-1ra e dois receptores IL-1 receptor tipo I (IL-1Rtl) e IL-1 receptor tipo II (IL-1RtII), mas apenas o receptor tipo I é ativo no endométrio (Simon et al., 1993; Sahakian et al., 1993) e o sistema IL-6 é composto por IL-6, IL-6 receptor (IL-6R) e GP-130 (Piquet-Pellorce et al., 1994).

Nos seres humanos, a IL-6 é fracamente expressa durante a fase proliferativa, durante a metade da fase secretória, sua expressão é alta, predominantemente nas células epiteliais glandulares e do lúmen (Tabibzadeh et al., 1995; Vandermolen e Gu, 1996). Além disso, a IL-6-R é localizada no epitélio glandular ao longo do ciclo menstrual (Tabibzadeh et al., 1995).

Fukuda et al. (1995), analisaram a expressão da IL-1 e IL-1ra no endométrio humano nas fases folicular e lútea, e puderam demonstrar que uma quantidade significativa de IL-1, principalmente de IL-1 β , foi expressa no endométrio humano e esta expressão foi constante durante todo o ciclo menstrual. Huang et al. (2001) examinaram a influência de hormônios esteroides na expressão de IL-1 β , IL-1ra e IL-1Rtl mRNA no estroma endometrial humano e obtiveram resultados que sugerem que a IL-1 β regula a expressão do sistema IL-1 nas células estromais do endométrio, podendo assim ser um importante mediador da implantação embrionária. Assim, a expressão adequada de IL-1ra pode ser fundamental para iniciar e manter o sucesso da interação embrio-epitelial.

Um estudo em camundongos demonstrou que o bloqueio da IL-1Rtl do endométrio materno pode interferir na implantação, porém sem efeitos

adversos na formação do blastocisto. Esta atribuição é dada pela baixa regulação das integrinas na superfície do epitélio luminal (Simon et al., 1994). Abbondanzo et al. (1996), em um estudo também com camundongos obtiveram resultados que revelaram que a deficiência de IL-1RtI pode causar uma ligeira redução no tamanho da ninhada, não afetando a implantação do embrião.

Em estudos *in vitro*, foi observado que a IL-1 estimulou a produção de IL-6 em células epiteliais endometriais humanas (Laird et al., 1994). Semer et al. (1991), em seu estudo com células estromais endometriais humana, observou que a IL-1 estimula a síntese de IL-6 e IL-6 mRNA. Arici et al. (1995) mostrou que a IL-1 regula a expressão de LIF em células endometriais humanas.

Vandermolen e Gu (1996) após conduzirem um estudo *in vivo*, sugerem que a expressão de IL-6 no endométrio humano aumenta com o desenvolvimento secretório do endométrio e que esta expressão ocorre sob a regulação da IL-1.

2 JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que:

(1) a exposição à poluição do ar da cidade de São Paulo é capaz de provocar uma diminuição da eficiência reprodutiva; incluindo um aumento significativo de perdas implantacionais (Veras et al., 2009).

(2) há evidências experimentais e epidemiológicas que relacionam a exposição à poluição do ar, principalmente o material particulado, com desfechos gestacionais negativos (baixo peso ao nascer, restrição do crescimento intrauterino, prematuridade).

(3) não há na literatura estudos clínicos e experimentais que tenham investigado os efeitos da poluição do ar ambiental sobre receptividade uterina;

Neste estudo foi proposta uma avaliação morfo-funcional do endométrio de fêmeas de camundongos expostas cronicamente a duas concentrações de material particulado concentrado ou ar filtrado, para avaliar se há ou não uma alteração na receptividade uterina que possa explicar este aumento nos índices de perdas implantacionais observada em estudos anteriores.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar se a exposição subcrônica ao material particulado do ar na cidade de São Paulo é capaz de alterar fatores associados à receptividade uterina à implantação embrionária.

3.1 Objetivos específicos

- a) Avaliar a composição elementar presente nos filtros de polycarbonato e quartzo;
- b) Avaliar a ciclicidade estral previamente ao acasalamento;
- c) Avaliar alterações nos folículos ovarianos;
- d) Quantificar os volumes e áreas de superfície das principais estruturas endometriais (glândulas, estroma, epitélio luminal e vasos), além da espessura do endométrio e dos epitélios luminais e glandulares;
- e) Caracterizar a expressão gênica no endométrio de:
 - Muc-1;

- LIF.

f) Quantificar IL-1 e IL-6 no fluido uterino;

g) Avaliar qualitativamente a presença de pinopódios na superfície apical das células epiteliais luminais do endométrio.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo utilizamos como modelo experimental o camundongo (Balb C, isogênico), uma vez que estes roedores apresentam ciclos estrais espontâneos e o processo fisiológico e celular de receptividade uterina e implantação são semelhantes ao que ocorre em humanos. As diferenças quanto ao controle hormonal do ciclo e expressão de fatores relacionados à receptividade uterina existem entre fêmeas de camundongos e mulheres e estão sendo consideradas neste estudo, assim somente os fatores que são similares às duas espécies estão sendo avaliados.

Para a avaliação dos efeitos da exposição ao material particulado sobre a receptividade uterina, os animais experimentais foram expostos a duas concentrações de MP, utilizando um concentrador de partículas ambientais (CPA), localizado na FMUSP. O CPA é um equipamento que foi desenvolvido pela Escola de Saúde Pública de Harvard–EUA e utiliza a tecnologia de impactadores virtuais, com o propósito de concentrar em até 30 vezes as partículas ambientais presentes na atmosfera sem modificá-las química ou fisicamente. Este equipamento permite o controle da concentração a qual os animais serão expostos, possibilitando estudos de dose-resposta. O ar, então carregando uma concentração determinada de partículas, alimenta uma câmara onde os animais serão expostos. Ao mesmo tempo e sob as mesmas condições de pressão, fluxo, temperatura e umidade relativa, outra câmara disposta paralelamente é alimentada com ar filtrado para exposição do grupo controle. Em ambas as câmaras os animais foram acondicionados em gaiolas apropriadas, permanecendo livres e

respirando naturalmente. Nos intervalos entre as exposições os animais foram mantidos em gaiolas (com 3 indivíduos) em estantes ventiladas recebendo ar filtrado, com ração e água disponíveis *ad libitum* e sob ciclo luz/escuro de 12hs/12hs (Alesco Ltda, Monte Mor, SP, Brasil). Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética para pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq-FMUSP), Protocolo nº 150/10.

4.1 Protocolo de Exposição

Foram avaliados 3 grupos de 10 fêmeas, expostas cronicamente desde o período de desmame (DPN21⁶) até atingirem a idade reprodutiva (DPN60) a duas concentrações de material particulado (MP600 ou MP1200) ou ar filtrado (C) . Paralelamente, um grupo de machos (n=5) foi mantido continuamente pelo mesmo período em estante ventilada recebendo ar filtrado (HEPA⁷) para o período de acasalamento. Os animais foram obtidos junto ao Biotério Central da Faculdade da Medicina da Universidade de São Paulo. As exposições tiveram início no DPN 21 e se estenderam até o dia da eutanásia (4ºDG).

As concentrações às quais os animais foram expostos foram determinadas com base nas exposições ambientais reais ao MP_{2,5}. A concentração de 600µg/m³ representa a concentração média diária total a que estamos sujeitos na cidade de São Paulo (CETESB, 2008) e ao dobro desta concentração, ou seja, 1200µg/m³. Os animais foram expostos diariamente (5 dias por semana) no período da manhã.

Ao atingirem a idade de 60 dias de vida, foi realizado o lavado vaginal nas fêmeas de camundongos para identificação das fases do ciclo estral. Com 74 dias, as fêmeas foram acasaladas, com machos que não foram expostos ao MP_{2,5}. O coito foi confirmado pela presença de um *plug* vaginal ou de espermatozoides no lavado vaginal. Na manhã do 4ºDG, as fêmeas foram eutanasiadas segundo métodos recomendados pelo painel de

6 DPN- dias pós-nascimento

7 HEPA – filtros com alta eficiência na retenção de material particulado.

eutanásia da *American Veterinary Medical Association* [fêmeas gestantes – pré-anestesia inalatória (ISOFLURANE) + injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (200mg.kg⁻¹ peso corporal)] (AVMA, 2013).

Um esquema do protocolo de exposição dos animais deste estudo pode ser visto na Figura 5.

Figura 5 - Esquema representativo do protocolo de exposição.

Na figura 6 é possível observar a câmaras de exposição ao ar ambiente e às partículas ambientais e os impactadores virtuais presentes no CPA.

Figura 6 - (A) câmara de exposição ao ar ambiente e as partículas ambientais concentradas ($MP_{2,5}$); (B) Vista lateral dos impactadores virtuais, tendo ao fundo as câmaras de exposição (Fonte: INAIRA).

4.2 Caracterização da exposição

A caracterização da exposição dos animais foi feita de duas maneiras:

1) Dose de exposição: A dose de exposição foi pré-estabelecida conforme descrito no item 4.1 Protocolo de exposição da seção Material e Métodos. O monitoramento da dose foi realizado em tempo real utilizando-se um nefelômetro⁸ (DataRAM 4000 Thermo Scientific®)

2) Análise da composição elementar do $MP_{2,5}$: foi realizada em conjunto com o Laboratório de Análise de Processos Atmosféricos- IAG-USP e nos permitiu saber a composição química do $MP_{2,5}$ presente na atmosfera da cidade de São Paulo. Resumidamente, as amostragens foram realizadas pelo desvio de uma fração do ar já carregado de partículas do CPA para um sistema de filtração por impacto. Os filtros de policarbonato e quartzo foram expostos por uma hora a um fluxo de 5 L/h; em seguida foram removidos e enviados para análise com auxílio de um espectrofotômetro de fluorescência de raio X (Shimadzu EDX 700).

3) Dose inalada: A dose inalada acumulada foi calculada multiplicando-se o volume total de ar inalado em 45 horas (1 hora por dia

⁸ Nefelômetro: instrumento utilizado para medir a densidade de partículas em um líquido ou gás que pelo emprego de um feixe de luz e um detector de luz mede a luz refletida pelas partículas.

durante 45 dias) pela taxa de respiração média (considerada 5,16L/horas) pela concentração de $MP_{2,5}$ ($600\mu\text{g}/\text{m}^3$ / $0,6\mu\text{g}/\text{L}$ – ou $1200\mu\text{g}/\text{m}^3$ / $1,2\mu\text{g}/\text{L}$).

O método de análise dos filtros de quartzo foi validado pelo Laboratório de Cromatografia do IQ/UNESP em material particulado atmosférico, e consiste na extração com solventes (DCM: metanol, 4:1) em banho de ultrassom (3 x 10min x 30mL), seguido de troca do solvente por acetonitrila. Este método quantifica os HPAs por HPLC/Flu (Andrade, 2004) e confirmado por GC/MS (Ré-Poppi, 2000).

4.3 Avaliação da receptividade uterina

4.3.1 Ciclo estral

Para a verificação de alterações na ciclicidade estral, as fêmeas foram submetidas à coleta de lavados vaginais diários durante um período de duas semanas, entre 8h – 10h da manhã, antes do acasalamento, o que nos forneceu dados sobre 3 ciclos, considerando ciclos normais de 4-6 dias (Morissey et al., 1988a; 1988b). Com o objetivo de se realizar uma análise quantitativa, definimos a ciclicidade estral como sendo o número de eventos da passagem do proestro para o estro, sendo esperado, como descrito acima, 3-4 passagens durante o período de 2 semanas; além disso, avaliamos o número de dias em estro exibido pela fêmea durante todo o período. As lâminas foram coradas pelo método de Shorr modificado e montadas (Montes et al., 1978). Os lavados vaginais foram avaliados por microscopia de luz para classificação do estágio do ciclo com base na preponderância de células epiteliais cornificadas, células epiteliais nucleadas e leucócitos (Quadro 3). Na Figura 7 é possível observar as fotomicrografias representativas de cada fase do ciclo avaliada neste estudo.

Figura 7 - Fotomicrografias de lavados vaginais de camundongos. (A) proestro, predominância de células epiteliais nucleadas; (B) estro, presença de células cornificadas anucleadas; (C) metaestro, que consiste em três tipos de células: leucócitos, cornificadas e epiteliais nucleadas; (D) diestro, constituídos predominantemente por leucócitos.

Quadro 3 – Classificação dos estágios do ciclo estral de acordo com a citologia vaginal (adaptada de Nelson et al., 1982).

Fase do ciclo	Células epiteliais superficiais	Células epiteliais nucleadas	Leucócitos
Diestro	Ausente	$\leq 10\%$	$\geq 60\%$
Proestro	Ausente	$\geq 60\%$	$\leq 10\%$
Metaestro	$\geq 60\%$	$\leq 20\%$	$\geq 20\%$
Estro	$\geq 90\%$	Ausente	Ausentes

4.3.2 Coleta dos materiais

Após a eutanásia, o abdômen foi aberto, o útero juntamente com os ovários foram removidos e acondicionados em uma placa de Petri esteril. Os ovários foram então, separados e fixados por imersão em solução de paraformaldeído 4% (PFA) em tampão fosfato 0,1M para contagem posterior do número de corpos lúteos. Os cornos uterinos foram então separados da porção cervical e de acordo com a técnica a ser empregada os seguintes procedimentos foram realizados:

a) Lavado uterino (dosagem de IL-1 β , IL-6): Para a realização deste lavado, um dos cornos foi separado e acondicionado em uma nova placa de Petri. O lavado foi realizado pela injeção de 400 μ L de soro fisiológico 0,9% com auxílio de uma seringa através do lúmen uterino. Após a coleta, o lavado foi centrifugado a 2000 RPM por 15 minutos, o sobrenadante foi congelado (-80°C) e o sedimento fixado em PFA 4% em tampão fosfato 0,1M.

b) Expressão gênica, estereologia (microscopia ótica), microscopia de varredura e transmissão: para esta outra etapa foi utilizado o corno remanescente. Assim, este foi subdividido em 4 partes iguais (Figura 8) e aleatoriamente os pedaços foram destinados às diferentes técnicas. Os fragmentos destinados à microscopia eletrônica e ótica foram fixados em glutaraldeído (2% + tempo 2 horas) e PFA 4% em tampão fosfato 0,1M (24 horas), respectivamente. Já o fragmento destinado à análise da expressão gênica foi adicionado RNA Later® (Invitrogen) e em seguida armazenado em freezer -80°C.

Figura 8 - Locais de secção do corno uterino de camundongo.

4.3.3 Estereologia das estruturas uterinas

A estereologia é um método bem estabelecido para gerar valores tridimensionais, como volume, áreas de superfície e comprimento de tecidos complexos a partir de cortes histológicos bidimensionais. Para a realização do estudo estereológico, consideramos o fragmento destinado a esta análise como nosso volume de referência (Howard e Reed, 2005; Mayhew, 2006).

Primeiramente, o fragmento fixado foi pesado e seccionado em fatias menores. Estas fatias foram processadas rotineiramente para inclusão em parafina e incluídas de forma a serem obtidos cortes transversais. Os blocos foram seccionados com auxílio de um micrótomo rotativo em cortes de 5µm de espessura. Foram coletados em lâminas comuns e em lâminas silanizadas pares de cortes consecutivos. O primeiro par foi selecionado aleatoriamente, e a cada 150µm (30 cortes) um novo par foi coletado, produzindo-se duas lâminas com 2 pares para cada técnica de coloração e para a técnica de imuno-histoquímica.

As seguintes técnicas de identificação foram utilizadas:

a) Hematoxilina & Eosina para análise histopatológica (Junqueira e Junqueira, 1983).

b) PAS (*Periodic Acid Schiff*) + *Alcian Blue* para identificação da membrana basal.

Os cortes foram então fotografados utilizando-se objetivas de pequeno (4X) e médio aumento (20X).

Na Figura 9 é possível observar uma representação e corte histológico do corno uterino - 5µm. Coloração: H&E.

Figura 9 - Representação e corte histológico do corno uterino – 5µm. Coloração: H&E. CME – Camada muscular externa (Miométrio); CMI – Camada muscular interna (Miométrio); E – Endométrio; EL – Epitélio luminal; G - Glândula; L – Luz uterina; PAM – Pólo antimesometrial.

A fração de volume (Vv) de cada compartimento uterino, endométrio, camada muscular interna e externa do miométrio e lúmen uterino foi avaliada pelo método de contagem de pontos (Howard e Reed, 2005). Para tanto um sistema teste de pontos foi sobreposto as imagens obtidas em aumento de 4x e os pontos incidentes sobre os compartimentos de interesse contados de forma diferencial. Assim de acordo com a fórmula (1) os Vvs foram calculados:

$$(1) Vv_{\text{comp}} = \sum P_{\text{comp}} / \sum P_{\text{Tot}},$$

onde $\sum P_{\text{comp}}$ é a somatória de pontos incidentes sobre o compartimento, como por exemplo, endométrio e $\sum P_{\text{Tot}}$ é a somatória de pontos incidentes no útero todo, incluindo os pontos incidentes no endométrio (Figura 10).

Figura 10 – Fotomicrografia do corno uterino de fêmea de camundongo com sistema teste de pontos realizado pelo software Image J para estimarmos os volumes dos compartimentos uterinos. Aumento: 4x. coloração: H&E.

A mesma técnica foi utilizada para estimarmos as frações de volumes das estruturas constituintes do endométrio, a saber: glândulas endometriais, estroma e epitélio luminal. Esta análise foi realizada em fotomicrografias obtidas em aumento de 40X.

O programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) foi utilizado para a realização das contagens e geração dos sistemas teste.

4.3.4 Avaliação da espessura dos compartimentos uterinos, epitélio luminal e glândulas endometriais

As lâminas coradas com PAS + *Alcian Blue* foram utilizadas para se avaliar as espessuras dos compartimentos uterinos utilizando-se métodos morfométricos. Para tanto, a espessura do endométrio e do miométrio foram mensuradas diretamente em quatro pontos distintos, selecionados em forma

de “X” (Figura 11) em 3-4 cortes transversais do corno uterino por fêmea. Da mesma forma foram obtidas as espessuras dos epitélios glandular e luminal; neste caso as medidas foram tomadas aleatoriamente tendo como referência a membrana basal que se cora de forma intensa pela técnica do PAS + *Alcian Blue* (Figura 12).

Figura 11 – Fotomicrografia do corno uterino de fêmea de camundongo exposta ao MP_{2.5}. Medidas das espessuras do endométrio e do miométrio selecionados em forma de “X”. Coloração: PAS + *Alcian Blue* – 500µm.

Figura 12 – Fotomicrografia do corno uterino de fêmea de camundongo exposta ao MP_{2.5}. Medidas das espessuras dos epitélios glandular e luminal. Coloração: PAS + Alcian Blue - 200µm.

Também foram medidos os diâmetros das glândulas endometriais, neste caso, somente as glândulas que apareciam em corte transversal foram mensuradas. Novamente estas medidas foram feitas de forma direta, duas medidas perpendiculares foram realizadas considerando o maior e o menor diâmetro por glândula. Em médias foram medidas de 4-8 por campo.

Todas as análises e medidas foram feitas utilizando como ferramenta o programa *Pannoramic Viewer*[®] v.1.15.2 (http://www.3dhistech.com/pannoramic_viewer).

4.3.5 Avaliação das alterações nos folículos ovarianos

A avaliação das alterações nos folículos ovarianos nas fêmeas expostas à poluição do ar foi realizada quantificando-se o número de corpos lúteos e o peso dos ovários. No momento da coleta os ovários foram

dissecados dos tecidos adjacentes pesados e fixados. O número de corpos lúteos presentes nos ovários foi contado diretamente com auxílio de uma lupa estereoscópica.

Após esta análise, os ovários foram processados rotineiramente para inclusão em parafina e incluídos de forma a serem obtidos cortes transversais. Os blocos foram seccionados com auxílio de um micrótomo rotativo em cortes de 5µm de espessura. O primeiro corte foi selecionado, e a cada 50µm (10 cortes) um novo corte foi coletado. A técnica de coloração utilizada foi de Hematoxilina & Eosina. Os cortes dos ovários (direito e esquerdo) foram dispostos em lâminas, em duas fileiras até o esgotamento do órgão.

Também foi realizada uma avaliação histopatológica dos cortes seriados dos ovários para quantificação dos folículos ovarianos (Figura 13). Nesta quantificação os folículos foram classificados em:

- pequenos: folículos primordiais e primários (ovócitos circundados por uma única camada de células foliculares);
- médios: Folículos secundários e antrais (ovócito primário em crescimento apresenta uma camada glicoproteica denominada zona pelúcida e uma quantidade de líquido folicular começa a se acumular entre as células foliculares formando pequenos espaços denominados antro folicular);
- grandes: Folículo maduro (ovócito se move para a zona cortical oposta a cavidade folicular apresentando camadas de células granulosas e grande quantidade de líquido folicular);
- Folículos atrésicos (folículos em degeneração).

Figura 13 – Cortes histológicos (5 μ m) dos ovários de fêmea de camundongo. FS- Folículo secundário; CL – Corpo lúteo; FP- Folículo primário e FM – Folículo maduro. Coloração: H&E. Aumento: 4x.

4.3.6 Avaliação imuno-histoquímica: MUC-1 e LIF

As reações imuno-histoquímicas para avaliação da imunomarcagem tecidual para LIF e MUC-1 foram realizadas pelo Laboratório de Imuno-histoquímica do Departamento de Patologia da FMUSP. Resumidamente, os cortes recolhidos em lâminas silanizadas foram desparafinados e hidratados (banhos de alcoóis em concentração decrescente e finalizada em banho de água deionizada). A recuperação antigênica foi realizada aquecendo-se os cortes em panela de pressão, a 125°C por 1 minuto em tampão citrato pH6,0. As reações inespecíficas foram bloqueadas com banho de leite desnatado 6% (30'). A peroxidase endógena foi bloqueada com banhos em água oxigenada 10 volumes 3% por 15 minutos (5 vezes) e depois lavados em água corrente e PBS. Após os bloqueios, os anticorpos primário anti MUC-1 (NeoMarkers RB9222; Epitope Specific Rabbit Antibody) [Titulação 1:200] ou anticorpo primário anti LIF (Santa Cruz Biotechnology sc1336; goat polyclonal IgG) [Titulação 1:200] foram diluído em BSA, sendo aplicado sobre os cortes e controles, positivo e negativo de tecido, lâminas incubadas “overnight” em geladeira 4 graus em câmara úmida.

Após a lavagem em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotinilado (Vetor- IgG goat e rabbit) durante 1 hora a 37°C. Após lavagem em PBS, procedeu-se a incubação pelo complexo avidina-biotina-

peroxidase (Dako L120SAB+) e, finalmente a reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos. Os núcleos foram evidenciados por contra-coloração com Hematoxilina de Harrys por 30 segundos. Os controles negativos foram preparados omitindo-se o anticorpo primário, e em seu lugar foi utilizado albumina fetal bovina.

Quantificação da imunomarcação

A densidade de área marcada positivamente para LIF e MUC-1 foi avaliada utilizando-se técnicas de análise de imagem. As medidas foram realizadas com auxílio do software Image J a partir de fotomicrografias representativas obtidas dos cortes com objetiva de 40x (Figura 14). A ferramenta “*colour deconvolution*” foi empregada para este fim. Esta ferramenta decompõe a imagem em 3 (Ruifrok e Jonhston, 2001).

A avaliação da imunomarcação foi feita respeitando-se os compartimentos (estroma, glândulas endometriais, epitélio luminal). Os marcadores utilizados foram escolhidos por seu reconhecido envolvimento na receptividade uterina, sendo um deles (LIF) um fator favorável e o outro desfavorável (MUC-1), além disso, ambos apresentam suas expressões reguladas por hormônios e estão direta ou indiretamente relacionados à formação dos pinopódios.

Figura 14 – Fotomicrografias decomposta pelo software Image J do corte histológico do corno uterino de fêmea de camundongo com o auxílio da ferramenta “*colour deconvolution*”.

4.3.7 Avaliação da Expressão gênica de MUC-1 e LIF no endométrio

Desenho e eficiência dos oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos *sense* e *antisense* específicos para cada gene (LIF e MUC-1) dos camundongos (*Mus musculus*) e para o gene candidato a controle interno (β -actina), foram desenhados utilizando-se o software Primer 3 (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) e sua especificidade foi verificada pelo *BLAST* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Os oligonucleotídeos *sense* e *antisense* foram escolhidos em éxons distintos para evitar amplificação de DNA genômico. As concentrações dos *primers* foram otimizadas. Na Tabela 1 encontram-se os oligonucleotídeos utilizados no ensaio de qPCR.

Tabela 1 – Oligonucleotídeos usados no ensaio de qPCR. (Lee et al., 2005; Xiong et al., 2012).

Oligonucleotídeos	Sequência	Tamanho do produto	Acesso Gene Bank
MUC-1	Senso 5' - CCATCCTATGAGTGAATACCCTACCT - 3'	118 pb	NM_013605
	Anti-senso 3' - AGAGAGACTGCTACTGCCATTACC - 5'		
LIF	Senso 5' - CCCATCACCCCTGTAAAT - 3'	180 pb	NM_008501
	Anti-senso 3' - GTTAGGCGCACATAGCTT - 5'		
β -actina	Senso 5' - CTGGCTCCTAGCACCAT - 3'	72 pb	NM_007393
	Anti-senso 3' - GCCACCGATCCACACAGAGT - 5'		

Extração de RNA total

Para a análise da expressão gênica, fragmentos do útero foram processados para extração de RNA total, utilizando-se a metodologia do isotiocianato de guanidina (Chomczynski e Sacchi, 1987), adicionando 500 μ L do reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por amostra. As amostras foram ligeiramente maceradas com um homogeneizador de tecidos (Politron, kinematic) e transferidas para microtubos de 1,5 mL. Logo foram

adicionados, 200µL de clorofórmio (Merck). Os tubos foram homogeneizados por inversão por 15 segundos e incubados por 2 minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos, a 12000g a 4°C. Após a centrifugação, a mistura foi separada em 3 fases: no fundo do tubo uma fase avermelhada (fenol + clorofórmio), uma interfase, e uma fase aquosa superior (onde está contido o RNA). A fase aquosa consiste em aproximadamente 60% do volume de Trizol utilizado no começo da homogeneização. Para precipitação do RNA, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo, as amostras de DNA foram descartadas e as proteínas foram armazenadas para futuras análises. À fase aquosa foram adicionados 500µL de álcool isopropílico (Merck) e incubado por 1 hora à temperatura ambiente. Após, os tubos foram centrifugados a 12000g por 10 minutos a 4°C. Seguindo da precipitação, formou-se um pellet em forma de gel no fundo e nas paredes dos tubos. O pellet precipitado foi então lavado com 1mL de etanol 75% (Merck) e centrifugado a 7500xg por 5 minutos a 4°C. Ao final do procedimento, as amostras foram secadas a vácuo, por 3 minutos e em seguida, foram dissolvidas em água DEPC (água previamente tratada com inibidor de RNase e autoclavada, dietilpirocarbonato – Merck) e incubadas por 10 minutos a 60°C para completa dissolução do RNA.

Utilizando o espectofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific), a concentração de RNA foi gerada em comprimento de onda 260 e 280nm, onde comprimento de 260nm refere-se à quantidade de ácido nucleico (OD de 1 representa 40ug/mL de RNA) e o 280nm refere-se à quantidade de proteína. A relação entre as absorbâncias nos comprimentos de onda 260/280nm foi considerada de boa qualidade quando dentro dos valores 1,70 a 2,0. A integridade do material foi verificada em gel de agarose (Promega). Foi utilizado 0,8% de agarose em MOPS 1x (2M MOPS, 0,5M de acetato de sódio e 0,1M de EDTA pH 7,0), 5% de formaldeído e brometo de etídio. Os RNAs extraídos foram preparados em tampão para RNA (53% de formamida, 6% formaldeído, 7% glicerol, 6% azul de bromofenol e 10% de MOPS 10x). As reações foram incubadas em banho-maria a 65°C por 15 minutos, em seguida colocadas em gelo por 2 minutos e aplicadas no gel. A

corrida de eletroforese foi realizada em tampão MOPS 1x com uma voltagem constante de 60 volts em temperatura ambiente até que as amostras estivessem com as bandas correspondentes aos RNA ribossomais 28S e 18S bem separadas. A banda foi considerada de qualidade satisfatória quando mostrada duas vezes mais intensa e sem a presença de arraste.

Síntese de cDNA

Foram utilizados 2µg de RNA total, 1µL de Oligo dT (Invitrogen) e foi completado o volume para 12µL com água DEPC para a síntese de cDNA. As amostras foram incubadas a 65°C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram resfriadas, centrifugadas e adicionou-se 4µL de tampão 5x *first-strand* (invitrogen), 2µL de DTT 0,1M e 1µL de dNTPs Mix 10mM. Foi adicionado 2µL da enzima *Superscript III RT* (200U/µL) e homogenizado lentamente seguida da incubação por 50 minutos a 50° C. A reação foi inativada a 70°C por 15 minutos e armazenado no freezer a – 20°C até o momento do uso.

PCR em Tempo Real

O fluoróforo *SYBR® Green* foi utilizado determinar a expressão dos genes MUC-1 e LIF. Este método fundamenta-se na intercalação do *SYBR® Green* na dupla fita de DNA e no monitoramento da fluorescência emitida em cada ciclo da amplificação. Pela curva de desnaturação verifica-se a especificidade da reação, que eleva a temperatura até que ocorra a desnaturação completa do produto da PCR, onde um único aumento de fluorescência é indicativo de uma reação específica (curva de *melting*).

Nas reações foram utilizados 20mM de Tris-HCL (pH8,4), 50mM de KCl, 200µM de dNTP, 5% de DMSO (Dimetil sulfoxide), 0,3µM dos oligonucleotídeos senso e antisenso para MUC-1, LIF e B-actina (tabela 1), 1,5mM de MgCl₂, 1,5x de *SYBR® Green*, 1,5U de *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) e 100ng do cDNA em um volume final de 20µL. As

amostras foram amplificadas com uma desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, hibridização a 58°C por 1 minuto, extensão a 72°C por um minuto. A curva de desnaturação foi realizada variando a temperatura no intervalo de 72°C a 99°C.

O gene da β -actina foi utilizado como normalizador para cada RNAm analisado. Todas as reações foram realizadas em duplicata e foi aceito uma variação entre a duplicata menor que 1,0 no seu C_t (ciclo do *Threshold*), conforme as especificações do fabricante do aparelho *Rotor-Gene RG3000* (Corbett Research). Para todas as reações foram utilizados um controle negativo. Além disso, em todos os ensaios foi utilizada uma amostra controle na qual não havia cDNA.

Para a avaliação do resultado obtido, foi utilizado o programa *Rotor-Gene 6* versão 6.0 (Corbett Research) e foram normalizados através do modelo matemático proposto por Pfaffl (2001).

$$R = (E_{\text{alvo}})^{\Delta C_T^{\text{alvo}}} / (E_{\text{normalizador}})^{\Delta C_T^{\text{normalizador}}}$$

A eficiência da amplificação dos oligonucleotídeos é correlato ao E_{alvo} e $E_{\text{normalizador}}$ é correlato a eficiência da amplificação dos oligonucleotídeos para o gene normalizador (β -actina). As eficiências foram calculadas como $10^{(-1/\text{slope})}$, sendo que o *slope* corresponde a inclinação da reta obtida quando se analisa a variação do C_T em função do *log* de diferentes quantidades de cDNA e uma eficiência de 100% da reação que equivale a 2. O ΔC_T^{alvo} é a média do C_T do gene alvo na amostra referência, subtraída da média do C_T do gene normalizador na amostra referência subtraída da média do C_T da amostra normalizadora.

4.3.8 Avaliação dos níveis de IL-1 β e IL-6

Os níveis de IL-1 β e IL-6 foram dosados nas amostras de fluido uterino coletado conforme descrito anteriormente no item 4.3.2 Coleta dos materiais

da seção Material e métodos. Estes exames foram realizados por ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se kits comerciais (BD OptEIA™ Set Mouse IL-1 β cod. 2666KI, BD OptEIA™ Set Mouse IL-6 cod. 2653KI e BD OptEIA™ Set Mouse IL-10 cod. 555252) conforme as especificações do fabricante. Brevemente, utilizando-se uma placa C96 Maxisorp – Nunc-ImmunoPlate (Thermo Fischer Scientific) diluiu-se 55 μ L do anticorpo de captura em 10 mL de PBS (concentração: 2 μ g/mL). Esta solução (100 μ L) foi colocada em cada poço e incubada por 12h em geladeira. Após a incubação a solução foi desprezada e os poços lavados por 3x com PBS (pH 7.0 + 0,05% de Tween) e bloqueadas por 2 horas com PBS + 1% de BSA. Após este período as placas foram lavadas novamente, e 50 μ L das amostras ou da curva padrão foram adicionadas, seguindo incubação por 2 horas à temperatura ambiente. Após nova lavagem, foram adicionadas 100 μ L do anticorpo de detecção específico para cada citocina: anti IL-1 β e anti-IL-6, seguindo incubação por 2 horas em temperatura ambiente. As placas foram lavadas novamente, a estreptavidina foi adicionada a cada poço e incubada por 20 minutos. Após a lavagem das placas, foi adicionado o reagente para revelar a reação. Após 30 minutos, a solução de bloqueio foi adicionada e realizou-se leitura em espectrofotômetro (450nm).

4.3.9 Estudo ultraestrutural do epitélio luminal endometrial: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise ultraestrutural por varredura e transmissão foi realizada para examinar a superfície luminal, a morfologia celular e organização do epitélio de revestimento uterino. Em adição, nesta análise avaliamos qualitativamente a superfície epitelial do lúmen uterino quanto à presença de pinopódios nas superfícies celulares.

Microscopia eletrônica de varredura

Esta avaliação foi realizada em colaboração com o Departamento de Cirurgia no Laboratório de Anatomia Microscópica e do Desenvolvimento da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

Para este estudo fragmentos do útero foram fixados em glutaraldeído 2,5% a 4°C. Após 24 horas de permanência no fixador, o material foi transferido para tampão fosfato 0,1M pH 7,4 por mais 24 horas. Na etapa seguinte, o material foi lavado para a remoção do muco e impregnado em uma solução de ácido tânico a 1% durante 10 minutos e novamente lavado em tampão fosfato por 10 minutos. A pós-fixação foi feita em tetróxido de ósmio a 1% por 2 horas. Seguindo a pós-fixação, as amostras foram lavadas em tampão fosfato por 1 hora e desidratadas em uma série de etanóis de graduação crescente (50%, 70%, 90% e 100%). Após a desidratação, a secagem do material foi realizada em um Secador de Ponto Crítico⁹. As amostras foram então fixadas em porta-espécimes metálicos e cobertas com ouro utilizando-se um metalizador ¹⁰. A observação e documentação fotográfica foi realizado utilizando um microscópio eletrônico de varredura LEO 435VP (Zeiss).

Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os fragmentos destinados a esta análise foram fixado em glutaraldeído a 2% em tampão fosfato 0,15M por 2 horas. Depois foi transferido para solução fisiológica e encaminhado ao LIM 59 - Laboratório de Biologia Celular da FMUSP, onde foram processados para inclusão em araldite. Cortes semi finos de 0,5-1µm foram cortados e corado com azul de toluidina. Com o auxílio de um ultramicrotomo, foram obtidos cortes ultrafinos (70 nm)

⁹ CPD 020 Balzers Union- Leichtenstein

¹⁰ Emitech K550- England, Emitech Ltda

utilizando uma faca de diamante. Em seguida, os cortes foram dispostos sobre uma tela de cobre. A análise das telas foi realizada com o auxílio de um microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM - 1010).

4.4 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software estatístico SPSS17. As médias (M), desvios (DP) e erros padrões (EP) foram calculados para cada grupo e parâmetro. Para monitorar a variação entre indivíduos de um mesmo grupo, nós também calculamos o coeficiente de variação observado (CV- desvio padrão/ média) para algumas variáveis.

A análise multivariada (One-Way ANOVA) foi utilizada para comparar os desfechos nos diferentes grupos e doses. Os dados que apresentaram uma distribuição não paramétrica foram “ranqueados” previamente. Quando revelou diferença estatisticamente significativa, a análise foi complementada com o pós-teste de Student Newman Keuls. Hipótese nula foi rejeitada ao nível de probabilidade de $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação dos filtros de policarbonato e quartzo

Durante o período de março de 2011 a junho de 2011, semanalmente foram expostos 2 filtros de policarbonato para amostragem do material particulado e para futura quantificação do seu perfil elementar. As análises foram realizadas no Laboratório de Análise dos Processos Atmosféricos (LAPAT) do Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas da Universidade de São Paulo. Os resultados das determinações da composição química do material colhido após concentração são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 – Análise descritiva da composição elementar de $MP_{2,5}$ (g/m^3) dos filtros de polycarbonato utilizado na exposição de fêmeas de camundogos Balb/C, no período de março de 2011 a junho de 2011. Os dados estão apresentados em média e desvio padrão.

Substância	Média	Desvio Padrão
$MP_{2,5}$	646,37	534,06
Na	0,53	0,71
Mg	0,36	1,08
Al	5,61	11,74
Si	6,49	14,92
P	0,58	1,52
S	9,37	8,18
Cl	0,77	1,05
K	3,46	6,51
Ca	3,27	7,26
Ti	0,64	1,45
V	0,01	0,02
Cr	0,01	0,04
Mn	0,16	0,26
Fe	5,3	11,62
Ni	0,01	0,02
Cu	0,1	0,16
Zn	0,5	0,72
Se	0	0
Br	0,04	0,05
Rh	0,05	0,09
Pb	0,02	0,04

Por meio da análise de componentes principais, foram identificados quatro fatores, os quais explicam 96% da variabilidade de composição do $MP_{2,5}$ concentrado e caracterizam a origem das emissões. Os fatores assim determinados podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores referentes à aplicação da técnica de análise de componentes principais, para o conjunto de dados das medidas elementares dos filtros de material particulado fino concentrado.

	Fatores			
	1	2	3	4
Na	-0,016	0,051	0,919	0,100
Mg	0,980	0,026	-0,059	0,100
Al	0,989	0,020	-0,027	-0,006
Si	0,993	0,045	-0,023	-0,006
P	0,124	-0,028	-0,134	0,877
S	-0,038	0,926	0,108	0,075
Cl	0,747	0,542	-0,179	0,054
K	0,968	0,056	-0,047	0,021
Ca	0,990	0,095	-0,039	-0,007
Ti	0,742	0,220	-0,119	-0,076
V	0,588	0,686	-0,008	-0,011
Cr	0,976	0,108	-0,055	0,067
Mn	0,958	0,083	-0,018	0,231
Fe	0,991	0,093	-0,024	-0,012
Ni	0,818	0,459	0,004	0,072
Cu	0,962	0,215	-0,016	0,029
Zn	0,813	0,397	0,143	-0,072
Se	-0,029	0,101	0,249	0,858
Rh	0,699	0,567	-0,203	-0,046
Pb	-0,074	-0,016	0,941	-0,019
Br	0,824	0,321	-0,049	0,119

O fator 1 é composto predominantemente por Mg, Al, Si, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Cu, Ni, Zn e Br. Estes dados podem estar associados ao tráfego em geral, talvez com um componente de resuspensão do solo (Ca). Cu e Ni são relacionados com fontes fixas, industriais (Monaci et al., 2000; Figueiredo et al., 2007). O fator 2 foi dominado por S, sendo relacionado a queima do diesel, dada a associação deste elemento com as emissões deste combustível (Schauer et al., 2006). O fator 3, associado ao Na e Pb (Figueiredo et al., 2007 e Carreras et al., 2009) e o fator 4 esteve associado ao P e Se.

A análise dos filtros de quartzo foi validada pelo Laboratório de Cromatografia do IQ/UNESP que quantificou os HPAs por HPLC/Flu (Andrade, 2004) e foi confirmado por GC/MS (Ré-Poppi, 2000). Na Tabela 4 observa-se a quantidade de HPAs encontrada nos filtros de quartzo (47mm) expostos aos MP_{2,5} durante o período de 2 horas.

Tabela 4 – Caracterização da fração orgânica do MP_{2,5} analisada em filtros recolhidos durante o período de exposição. Valores são apresentados em média (ng/m³, nanogramas por metros cúbicos de ar) por 16 filtros.

Substância	ng/m ³
Acenafitileno	0,12
Fluoreno	0,07
Fenantreno	0,31
Antraceno	0,33
Pireno	0,18
Benzo (a) antraceno	0,28
Criseno	0,44
Benzo (b) fluoranteno + Benzo (k) fluoranteno	1,1
Benzo (a) pireno	0,27
Indeno (1,2,3-cd) pireno	0,42
Dibenzo antraceno	0,37
Benzo (g, h, i) perileno	0,58

Dose inalada: A dose inalada estimada acumulada para as fêmeas expostas ao material particulado nas concentrações de 600µg/m³ e de 1200µg/m³ foi de 139,32µg e 278,64µg, respectivamente. A dose diária de MP_{2,5} foi de aproximadamente 0,147µg.g para a dose de 600µg/m³ e 0,294µg.g para a dose de 1200µg/m³ peso corporal por dia.

5.2 Ciclicidade estral

Na Figura 15 observa-se que os animais expostos a concentração de $1200\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$ apresentaram um aumento no número de ciclo estrais quando comparado ao grupo Ar Filtrado ($p=0,02$) e quando comparado aos animais expostos a concentração de $600\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Na Figura 16 há uma redução no comprimento do ciclo estral nos animais expostos a $1200\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$ quando comparado aos animais expostos ao ar filtrado ($p=0,03$).

Na proporção de dias em estro (Figura 17) é possível observar que houve apenas uma redução nos animais expostos a concentração de $1200\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$ quando comparado aos animais expostos ao ar filtrado ($p= 0,03$).

* $P= 0,02$ quando comparado ao grupo Ar Filtrado

† $P= 0,003$ quando comparado ao grupo 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$

Figura 15 – Representação gráfica do número de ciclos estrais de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ e $1200\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$. Observa-se um aumento no número de ciclos estrais nas fêmeas expostas a concentração de $1200\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$ quando comparado ao Ar Filtrado e ao grupo $600\mu\text{g}/\text{m}^3$.

* P= 0,03 quando comparado ao grupo Ar Filtrado

Figura 16 – Representação gráfica do comprimento do ciclo estral de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. Observa-se uma diminuição no comprimento médio do ciclo estral de fêmeas expostas a 1200µg/m³ de MP_{2,5} quando comparadas ao grupo Ar Filtrado.

* P= 0,02 quando comparado ao grupo Ar Filtrado

Figura 17 – Representação gráfica da proporção de dias em estro de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. A proporção média dos dias em estro analisados em fêmeas de camundongos expostas a concentração de 1200µg/m³ mostra-se reduzida quando comparada ao grupo Ar Filtrado.

5.3 Alterações nos folículos ovarianos

Não foi observadas alterações entre os grupos estudados referentes ao número de corpos lúteos presentes nos ovários destes animais (figura 18).

Na Figura 19, o peso corporal dos animais não apresentou alteração significativa. Entretanto, o peso dos ovários das fêmeas de camundongos expostas a maior concentração de $MP_{2,5}$ ($1200\mu\text{g}/\text{m}^3$) mostrou-se maior quando comparados ao grupo Ar Filtrado ($p=0,02$) e quando comparado ao grupo exposto a concentração de $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p=0,02$) [Figura 20]. Um aumento é observado na razão (peso dos ovários/peso corporal) apenas para os animais expostos a concentração de $1200\mu\text{g}/\text{m}^3$ quando comparado aos animais expostos a $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p=0,03$) [Figura 21].

Na avaliação histopatológica dos cortes seriados dos ovários, foram quantificados os folículos ovarianos (pequenos, médios, grandes e atresícos). Nos animais expostos a menor concentração de poluente ($600\mu\text{g}/\text{m}^3$), os folículos médios mostraram-se mais frequentes dos que nos animais expostos ao ar filtrado ($p=0,003$). Para os animais expostos a maior concentração ($1200\mu\text{g}/\text{m}^3$) de $MP_{2,5}$, a frequência com que estes folículos médios foram observados, mostrou-se reduzido quando comparado com grupo exposto a $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $MP_{2,5}$ ($p=0,002$).

Para os parâmetros folículos atresícos, pequenos e grandes não foram observados alterações significativas, porém os animais expostos a concentração de $1200\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $MP_{2,5}$ apresentaram maior quantidade de folículos grandes quando comparado aos animais expostos a concentração de $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $MP_{2,5}$.

Figura 18 – Representação gráfica do número de corpos lúteos presente no ovário de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. O número de corpos lúteos presentes nos ovários dos animais expostos as concentrações de MP_{2,5} não apresentou alteração significativa quando comparado aos animais expostos ao ar filtrado.

Figura 19 – Representação gráfica do peso corporal de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. O peso corporal (g) das fêmeas de camundongos expostas à poluição particulada não apresentou alteração significativa quando comparado aos animais expostos ao ar filtrado.

Figura 20 – Representação gráfica dos pesos do ovário de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. As fêmeas de camundongos expostas a 1200µg/m³ de MP_{2,5} apresentaram maior peso dos ovários (g) quando comparado a ambos os grupos Ar Filtrado e 600µg/m³.

Figura 21 – Representação gráfica da razão (peso do ovário/peso corporal) de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. Observa-se um aumento significativo apenas para os animais expostos a concentração de 1200µg/m³ quando comparado aos animais expostos a 600µg/m³.

5.4 Parâmetros volumétricos dos compartimentos uterinos

Uma comparação foi realizada entre as médias e desvios padrões relativa aos parâmetros referentes à densidade de volume dos compartimentos uterinos (miométrio, endométrio e lúmen uterino).

Observa-se na Figura 22, que nenhuma alteração significativa ocorreu na densidade de volume das camadas miométrio, endométrio e lúmen uterino.

Figura 22 – Representação gráfica da densidade de volume do endométrio, miométrio e do lúmen uterino de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$. A exposição à poluição particulada ($\text{MP}_{2,5}$) não interferiu sobre a densidade volumétrica dos compartimentos uterinos na fase inicial da gestação.

5.5 Parâmetros volumétricos dos compartimentos endometriais

Foram obtidos dados referentes à média, desvios e erro padrão da densidade de volume dos compartimentos endometriais (glândula, estroma e epitélio luminal) nos diferentes grupos experimentais.

A densidade de volume das glândulas presentes no endométrio apresentou uma alteração nos animais expostos a $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$ quando comparado aos animais expostos ao ar filtrado, onde foi observado um aumento significativo ($p=0,01$). Para os animais expostos a concentração de $1200\mu\text{g}/\text{m}^3$ foi observada uma redução na densidade de volume das glândulas endometriais quando comparado ao grupo exposto à concentração de $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ ($p= 0,001$).

A densidade de volume estromal também apresentou diferenças significativas. Ao contrário do ocorrido com a densidade de volume das glândulas, a densidade de volume do estroma mostrou-se maior nos animais expostos à concentração de $1200\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$ quando comparado ao com o grupo exposto a concentração de $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$ ($p= 0,01$).

No que se refere à densidade de volume do epitélio luminal, não foram observadas alterações significativas entre os grupos estudados. Estas alterações na densidade de volume dos compartimentos deciduais podem ser vistas na Figura 23.

Figura 23 – Efeitos da exposição à poluição particulada ($MP_{2.5}$) sobre a composição volumétrica dos compartimentos endometriais na fase inicial da gestação em fêmeas de Camundongo Balb/C (4^o DG). Os animais expostos à concentração de 600µg/m³ apresentaram um aumento na proporção glandular quando comparado ao grupo Ar Filtrado. Os animais expostos à concentração de 1200µg/m³ apresentaram uma redução na proporção glandular quando comparado ao grupo 600µg/m³ e um aumento na proporção estromal quando comparado ao grupo 600µg/m³.

5.6 Espessura dos compartimentos uterinos

Foram obtidos os valores referente às espessuras (µm) dos epitélios glandular e luminal, endométrio, miométrio e diâmetro glandular dos grupos expostos ao $MP_{2.5}$ e ar filtrado.

Na Figura 24, observa-se um aumento significativo na espessura do epitélio glandular e do epitélio luminal. Nos animais expostos a concentração de 600µg/m³ de $MP_{2.5}$ quando comparado ao grupo Ar Filtrado foi observado um aumento nas espessuras do epitélio glandular ($p= 0,001$) e do epitélio luminal ($p= 0,01$). Os animais expostos a concentração de 1200µg/m³ de $MP_{2.5}$ apresentaram um aumento na espessura do epitélio glandular quando

comparado aos animais do grupo Ar Filtrado ($p= 0,001$), porém estes animais não apresentaram alterações na espessura do epitélio luminal.

Na Figura 25 observamos que não ocorreram alterações significativas quanto à espessura do miométrio e do endométrio entre os grupos estudados.

Para o parâmetro diâmetro glandular, a avaliação revelou que houve diferenças significativas entre os grupos. As fêmeas expostas às duas concentrações de $MP_{2,5}$ apresentam glândulas endometriais com diâmetros aumentados quando comparadas aos animais expostos ao ar filtrado ($600\mu g/m^3$ - $p= 0,03$) e $1200\mu g/m^3$ - $p= 0,001$) [Figura 26].

Figura 24 – Representação gráfica da espessura do epitélio glandular e do epitélio luminal de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, $600\mu g/m^3$ e $1200\mu g/m^3$ de $MP_{2,5}$. A exposição a concentração de $600\mu g/m^3$ de $MP_{2,5}$ provocou o aumento na espessura dos epitélios luminal e glandular do endométrio destes animais. Os animais expostos a concentração de $1200\mu g/m^3$ apresentaram apenas um aumento na espessura do epitélio glandular quando comparado ao grupo Ar Filtrado.

Figura 25 – Representação gráfica da espessura do endométrio e do miométrio de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. Não foi observado alterações entre os grupos.

Figura 26 – Representação gráfica do diâmetro das glândulas presentes no endométrio de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. O diâmetro (µm) das glândulas uterinas dos animais expostos às duas concentrações de MP_{2,5} sofreram aumentos significativos quando comparados aos animais que receberam ar filtrado.

5.7 Expressão gênica de MUC-1 e LIF

Fragmentos do útero de fêmeas de camundongo expostas ao ar filtrado e a duas concentrações de $MP_{2,5}$, foram processados para extração de RNA e utilizando o PCR em tempo real para a determinação da expressão gênica de MUC-1 e LIF.

Esta análise evidencia que a exposição ao $MP_{2,5}$ não altera a expressão transcricional, tanto para LIF quanto para MUC-1 em fêmeas de camundongo expostas às duas concentrações ($600\mu g/m^3$ e $1200\mu g/m^3$) quando comparado ao grupo controle durante o período peri-implantacional ($4^\circ DG$) [Figura 27].

Figura 27 – Representação gráfica da expressão relativa do gene LIF no corno uterino de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, $600\mu g/m^3$ e $1200\mu g/m^3$ de $MP_{2,5}$. A expressão gênica de LIF não se mostrou alterada em fêmeas de camundongo expostas a duas concentrações ($600\mu g/m^3$ e $1200\mu g/m^3$) durante o período implantacional.

5.8 Avaliação imuno-histoquímica: MUC-1 e LIF

Para a avaliação imuno-histoquímica foi quantificada a proporção média de área imunomarcada para LIF nos compartimentos uterinos (epitélio luminal, glândula e estroma) e para MUC-1 no epitélio luminal dos animais expostos ao ar filtrado e as duas concentrações de MP_{2,5}.

Uma redução significativa foi observada para a expressão de LIF nas frações de áreas imunomarcadas, tais como, epitélio luminal ($p=0,0002$), glândulas ($p=0,000002$) e estroma ($p=0,004$) nos animais expostos ao ar filtrado/MP_{2,5}. Observa-se que os animais expostos as duas concentrações de MP_{2,5} foram afetados, podendo observar maior redução da expressão de LIF nos animais expostos à maior concentração quando comparado ao grupo exposto ao ar filtrado (Figura 28).

Nenhuma alteração foi observada na expressão de MUC-1 no epitélio luminal do corno uterino dos animais avaliados neste estudo (Figura 29).

Na Figura 30 observam-se as áreas imunomarcadas para LIF e MUC-1 nas secções histológicas do epitélio luminal, glândulas e estroma endometrial de fêmeas de camundongos expostas ao ar filtrado (ADG), 600µg/m³ (BEH) e 1200µg/m³ (CFI). Imuno marcadas para LIF (ABC) e MUC-1 (DEF). As imagens GHI mostram a expressão de LIF nas glândulas e estroma endometriais em fêmeas de camundongos no 4ºDG. Menor intensidade destas marcações são notadas nos grupos expostos ao MP_{2,5} quando comparado as fêmeas expostas ao ar filtrado.

Figura 28 – Representação gráfica dos efeitos da exposição à poluição particulada ($MP_{2,5}$) a proporção média de área imunomarcada para LIF na fase inicial da gestação em fêmeas de Camundongo Balb/C (4º DG). Observa-se uma diminuição significativa na expressão de LIF no epitélio luminal, nas glândulas e estromas endometriais nos grupos expostos ao $MP_{2,5}$.

Figura 29 – Representação gráfica da área imunomarcada para MUC-1 no epitélio luminal de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}. A exposição às duas concentrações de MP_{2,5} não alterou a expressão de MUC-1 no epitélio luminal do corno uterino de fêmeas de camundongos (4º DG).

Figura 30 – Fotomicrografia de secções histológicas do epitélio luminal, glândulas e estroma endometrial de fêmeas de camundongos expostas ao ar filtrado (ADG), 600µg/m³ (BEH) e 1200µg/m³ (CFI). Escala: 50µm.

5.9 Dosagem dos níveis de IL-1 β e IL-6

Os níveis de IL-1 β e IL-6 foram dosados nas amostras de lavado uterino de fêmeas de camundongo expostas por 45 dias ao ar filtrado e a duas concentrações de MP_{2,5} (600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Na figura 31 observa-se que nenhuma das interleucinas avaliadas neste estudo sofreram alterações significativa nos animais expostos às concentrações de 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP_{2,5} quando comparado ao grupo Ar Filtrado.

Figura 31 – Representação gráfica da concentração média das interleucinas IL-1 β e IL-6 no lavado uterino de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao Ar Filtrado, 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP_{2,5}. A concentração média das interleucinas avaliadas no lavado uterino de fêmeas de camundongo expostas a 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP_{2,5} não apresenta alteração significativa quando comparado ao grupo Ar Filtrado.

5.10 Estudo ultraestrutural do epitélio luminal endometrial: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A avaliação da superfície luminal do útero de fêmeas de camundongos no 4ºDG revelou que nos animais expostos ao material particulado há uma clara diminuição no número de pinopódios, bem como uma irregularidade maior no tamanho destas estruturas. Nas fêmeas expostas a maior concentração de $MP_{2,5}$ a presença destas estruturas é rara, onde são observados, tratam-se de protusões extremamente pequena. Nos animais controle (ar filtrado) a distribuição do pinopódios parece estar confinada às pregas da mucosa endometrial e estes se distribuem em grupos. A avaliação ultraestrutural das células que compões o epitélio luminal nos mostra que nos animais expostos ao $MP_{2,5}$ houve ainda a presença de microvilosidades na superfície apical destas células, estas que também aparentam ter uma menor atividade sintética dado que sua cromatina está mais condensada (Figura 32).

Figura 32 – Efeito de exposição pré-gestacional a duas concentrações de $MP_{2.5}$ ou ar filtrado sobre as características ultraestruturais do epitélio luminal uterino de camundongos no 4ºDG. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do revestimento uterino de fêmeas de camundongos expostas ao ar filtrado (AD) mostrando a distribuição dos pinópódios (seta) nas pregas da mucosa uterina; $600\mu g/m^3$ de $MP_{2.5}$ (BE) mostra uma redução no número de pinópódios e irregularidade no tamanho destas estruturas (seta); $1200\mu g/m^3$ de $MP_{2.5}$ (CF) a presença destas estruturas é rara, tratando-se pequenas protusões; GHI – Eletrofotomicrografia da membrana plasmática apical das células epiteliais uterinas de fêmeas de camundongos demonstrando a presença de pinópódios (seta) em fêmeas expostas ao ar filtrado (G) e microvilosidades (seta) nos animais expostos a $600\mu g/m^3$ de $MP_{2.5}$ (H) e $1200\mu g/m^3$ de $MP_{2.5}$ (I).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo avaliamos os efeitos da exposição sub-crônica a poluição do ar de origem veicular sobre marcadores da receptividade uterina em camundongos. A fertilidade depende da interação entre o embrião e o útero receptor competente. Um endométrio não receptivo pode ser considerado um fator determinante de infertilidade. Diversos eventos estruturais,

bioquímicos, moleculares e genéticos estão envolvidos no estabelecimento da receptividade endometrial que está sob o comando dos hormônios esteroides. O período em que o endométrio permanece receptivo ao embrião é chamado de janela de implantação.

Ultimamente, dados epidemiológicos e estudos experimentais têm demonstrado que fatores ambientais têm contribuído para a infertilidade humana. Estudos prévios, epidemiológicos e experimentais, mostram que a poluição do ar está associada a desfechos negativos sobre a função reprodutiva, a fertilidade, fecundabilidade, gestação, perdas gestacionais precoces e a saúde fetal (Dejmek et al., 2000; Glinianaia et al., 2004; Srám et al., 2005; Perin et al., 2010).

Determinar exatamente a influência destes poluentes sobre a saúde reprodutiva feminina é muito difícil devido à interação com outros fatores de difícil controle, tais como, idade, deficiências na ovulação, obstrução das tubas uterina, endometriose, alterações hormonais, anormalidades uterinas (ex: decidualização imperfeita), estresse e estado nutricional comprometido (Homan et al., 2007).

Estudos prévios, tanto epidemiológicos e experimentais, têm mostrado consistentemente que indivíduos expostos cronicamente à poluição do ar apresentam fertilidade diminuída (Selevan et al., 2000; Somers, 2011) e mães gestantes têm riscos maiores de apresentar desfechos gestacionais negativos, tais como baixo peso, parto prematuro e restrição de crescimento intra-uterino (Backes et al., 2013).

Na literatura há apenas um estudo conduzido em humanos que avaliou a associação entre perdas gestacionais e a exposição à poluição do ar. Neste estudo, Perin et al. (2010) demonstraram que há uma associação entre as exposições breves a níveis elevados de MP_{10} durante o período periconcepcional e perdas gestacionais precoces em casais que passaram por procedimentos de fertilização in vitro. Dados experimentais, embora limitados, mostraram que os estágios iniciais da gestação e da formação do embrião podem também ser adversamente impactados por constituintes da poluição do ar. (Mohallen et al. 2005; Veras et al. 2009; Januário et al. 2010).

Neste estudo mostramos que a ciclicidade estral (correspondente aos ciclos menstruais em humanos) foi afetada pela exposição às diferentes doses de $MP_{2,5}$. A ciclicidade estral foi avaliada previamente ao acasalamento, o que nos forneceu dados sobre as fases do ciclo, proestro, estro, metaestro e diestro, considerando ciclos normais de 4-5 dias. Observamos o número de eventos da passagem do proestro para estro, sendo esperado 3-4 passagens e o número de dias em estro no período de 2 semanas. Os resultados mostram que fêmeas de camundongo expostas a maior concentração de $MP_{2,5}$ ($1200\mu\text{g}/\text{m}^3$) apresentaram alterações na duração do ciclo, estando este reduzido devido a diminuição dos dias em estro.

Entretanto, Veras et al. (2009) em seu estudo, mostraram que não apenas a duração do ciclo foi afetada mas também houve a indução de estro permanente. Contrariamente, os ciclos se mostraram mais longos. No estudo de Veras et al. (2009) foram avaliadas a 2ª geração de fêmeas de camundongos; e a exposição foi realizada em câmaras de topo aberto, onde os animais eram expostos tanto ao $MP_{2,5}$ quanto a gases como CO , NO_2 e SO_2 . As diferenças entre os achados de nosso estudo e do estudo de Veras et al. (2009) podem estar relacionadas a diferenças no desenho experimental, método utilizado para a realização da exposição dos animais e os tipos de poluentes aos quais os animais foram expostos. No estudo de Veras et al. (2009) embora os animais tenham sido expostos a concentrações ambientais de $MP_{2,5}$, o sistema de exposição utilizado não fazia a retenção dos gases poluentes presentes no ar ambiente. O uso do concentrador de partículas nos permitiu realizar exposições controladas a apenas a fração particulada da poluição, sem exposição concomitante a gases. Mamatsashvili, 1970, avaliou os efeitos da exposição inalatória ao monóxido de carbono e ao dióxido de enxofre sobre parâmetros reprodutivos em ratos e os resultados mostram que há efeitos sobre a ciclicidade estral, evidenciados por estro prolongado; Mas estes efeitos foram somente observados quando as fêmeas eram expostas pré e pós-natal a SO_2 ($4\text{mg}/\text{m}^3$ - $\sim 1,500\text{ppb}$) e a mistura de CO e SO_2 ($2\text{mg}/\text{m}^3$ + $4\text{mg}/\text{m}^3$,

respectivamente. Assim, o fato de um estudo apontar um aumento na duração do ciclo e o outro uma diminuição podem estar relacionados à exposição conjunta a gases e material particulado.

Não há na literatura muitos estudos experimentais que tenham avaliado a toxicidade reprodutiva de gases poluentes. Os estudos epidemiológicos que correlacionam a exposição aos diversos poluentes e desfechos sobre a saúde reprodutiva em humanos mostram uma associação entre exposições ao SO₂ e desfechos gestacionais negativos tais como baixo peso ao nascer e prematuridade. No entanto não há nenhuma informação sobre os efeitos dos gases sobre o ciclo menstrual, e também não há estudos de exposição ocupacional.

A outra diferença entre o presente estudo e o estudo de Veras et al. (2009) está no desenho experimental e tempo de exposição. Veras et al. (2009) utilizou um modelo de exposição crônica (24hs/dia, 7 dias/semana) as concentrações ambientais reais em multigeração; e as fêmeas avaliadas quanto à ciclicidade estral eram da segunda geração de animais gerados e crescidos dentro das câmaras. No nosso modelo utilizamos uma exposição subcrônica a duas concentrações conhecidas de MP_{2,5} (5 dias/semana, 1-2 horas por dia) durante 45 dias e nos 4,5 primeiros dias de gestação.

Embora o perfil hormonal das fêmeas não tenha sido avaliado em nosso estudo¹¹, as alterações observadas são compatíveis com respostas observadas em outros estudos nos quais o perfil hormonal foi avaliado.

Quanto à duração do ciclo estral é possível observar claramente uma relação dose resposta, onde ocorreu uma redução no comprimento do ciclo nos animais expostos a 1200µg/m³ de MP_{2,5} quando comparado aos animais expostos ao ar filtrado. Isto significa que houve um encurtamento dos ciclos, ou seja, as fêmeas expostas as diferentes concentrações de MP apresentaram ciclos com duração média de 4,5 dias enquanto as fêmeas não expostas apresentaram ciclos de 6 dias. A proporção de dias em estro

¹¹ A avaliação do perfil hormonal das fêmeas deste estudo não foi realizada devido a dificuldades técnicas e falta de equipamentos com nível de detecção necessário e o diminuto volume de soro sanguíneo. As avaliações estão planejadas e serão realizadas por métodos cromatográficos em parceria com o Instituto de Química da USP.

apresentou redução significativa, sendo possível observar que houve uma diminuição em ambos os grupos de animais expostos ao MP_{2,5} quando comparado aos animais expostos ao ar filtrado.

Em um estudo conduzido na China, foi avaliado o ciclo estral de fêmeas de camundongos que receberam injeções com ftalatos extraído da água de torneira da cidade de Chongqing, por 15 dias, e foi observado que os animais que apresentaram um prolongamento do ciclo e um aumento nos dias em estro e para os animais que receberam a dosagem por 30 dias estes fenômenos desapareceram (Xu et al., 2010). Estes ftalatos são produtos químicos sintéticos utilizados como aditivo para deixar o plástico mais maleável. Por ser um disruptor endócrino, ele prejudica a função reprodutiva e a fertilidade em roedores, podendo causar diminuição nos níveis séricos de estradiol, prolongamento do ciclo estral e ausência de ovulação nestes animais (Davis et al., 1994; Lovekamp-Swan e Davis, 2003; Lovekamp-Swan et al., 2003).

Estudos realizados por Baligar e Kaliwal (2002) avaliaram os efeitos do pesticida carbofurano sobre a ciclicidade estral e também foi observado que há uma diminuição nos dias em estro em animais que receberam 1,3mg/Kg e 1mg/Kg ao dia por 30 dias. A exposição ao fungicida Mancozeb também causou diminuição tanto no número de ciclo quanto no número de dias em estro em animais expostos a 400mg/Kg, 600mg/Kg e 800mg/Kg por dia durante 30 dias (Parimala e Kaliwal, 2005). Este fungicida, assim como os alguns compostos da poluição do ar também apresentam uma ação antiestrogênica causando diversos problemas relacionados à reprodução, tais como alteração no crescimento ovariano, no desenvolvimento folicular e na ciclicidade estral.

A análise semi-quantitativa dos folículos (pequenos, médios, grandes e atresícos) e do número de corpos lúteos servem como indicadores da função ovariana, assim como de respostas tóxicas a diferentes agentes ou compostos químicos. Uma redução na proporção dos folículos grandes e um aumento nos folículos médios foi observada nos animais expostos a dose de 600µg/m³ de MP_{2,5} quando comparados ao grupo controle e a dose mais

alta. Este efeito pode ser interpretado como uma diminuição temporária na fertilidade. Curiosamente não foram observadas diferenças nos animais expostos a maior dose quando comparados ao controle.

O processo de desenvolvimento e maturação dos folículos ovarianos envolve uma série de etapas e tem seu início nas mulheres ao atingirem a idade reprodutiva. Sabe-se que ao nascerem, as mulheres assim como os roedores já nascem com uma reserva definida de folículos ovarianos, que ao longo da vida reprodutiva serão recrutados ciclicamente. O processo de ovulação tem seu início da puberdade, os hormônios FSH e LH começam a ser secretados pela hipófise anterior e o seus níveis aumentam moderadamente, causando o crescimento acelerado dos folículos primordiais. Sob a ação do FSH, ocorre uma rápida proliferação das células granulosas que os circundam, levando ao surgimento de uma nova camada de células chamada de teca. Esta que se divide em duas camadas, a teca interna, responsável pela secreção de hormônios esteroides e a teca externa torna-se a cápsula do folículo. Na medida em que os folículos crescem a massa de granulosa secreta então o estrogênio dando origem ao antro folicular, ou seja, o folículo secundário ou antral. Os folículos antrais começam a crescer, antes de ocorrer à ovulação, um dos folículos cresce mais que os outros. Os outros involuem, tornando-se atresícos. Ainda sob o efeito do LH, folículo maior continua a crescer tornando-se maduro até o momento da ovulação fazendo com que as células granulosas e tecais comecem a secretar progesterona (Guyton e Hall, 2011). A maturação e a ovulação são similares entre camundongos e humanos, apresentando alterações apenas na quantidade de folículos maduros liberados no momento da ovulação (Rendi et al., 2012).

A redução no número de folículos grandes nos ovários das fêmeas expostas a $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$, sugere que componentes da poluição do ar particulada podem estar interferindo no processo de maturação destes folículos e conseqüentemente afetar a secreção dos hormônios esteroides.

Porém, o número total de corpos lúteos presentes nos ovários das fêmeas expostas a maior dose de $\text{MP}_{2,5}$ está aumentado; o que pode indicar

que há um efeito reversível em relação aos animais expostos a menor dose ou que este efeito seja mesmo uma resposta extrema a exposição. Nestes animais (dose $1200\mu\text{g}/\text{m}^3$) também houve um aumento na quantidade de folículos atrésicos, embora não significativa.

Na avaliação de Xu et al. (2010) sobre os efeitos reprodutivos dos extratos orgânicos compostos por ftalatos também houve maior quantidade de folículos atrésicos e no número de corpos lúteos, mostrando que a exposição a disruptores endócrinos, mesmo em baixas doses, é capaz de afetar o processo de maturação folicular e ovulação.

Com relação ao peso dos ovários, os animais expostos ao $\text{MP}_{2,5}$ apresentaram um aumento. Este aumento no peso dos ovários pode estar relacionado a um aumento no tecido estromal dos ovários. A avaliação histopatológica indicou que há uma tendência de aumento também no número de folículos atrésicos. Estes folículos atrésicos, são folículos em processo de degeneração e que por sua vez serão substituídos por tecido conjuntivo fibroso. A perda de folículos ovarianos pelo processo de atresia pode ocorrer em qualquer estágio de desenvolvimento/maturação destes folículos e as causas são diversas.

Qualquer composto capaz de perturbar o desenvolvimento folicular bem como o processo de degeneração destes folículos (atresia) podem afetar a função reprodutiva e as funções endócrinas e os efeitos irão depender do tipo de folículo afetado. Em nosso estudo os folículos mais afetados foram os folículos grandes (antrais). Agentes tóxicos que destroem os folículos primordiais podem resultar em infertilidade permanente, pois estes folículos não podem ser repostos. Já a depleção de folículos primários pode provocar infertilidade temporária. A infertilidade temporária ocorre quando um ou mais estágios do desenvolvimento folicular, que não o primordial, são afetados. No caso da ação de um agente tóxico, a suspensão da exposição permitiria que os folículos voltassem a seguir no processo de maturação. Além disso, a ação de toxicantes que provocam um aumento na atresia dos folículos, em qualquer fase de desenvolvimento, pode levar a senescência reprodutiva precoce (Gupta et al., 2007). Os mecanismos de

ação dos toxicantes dependem de suas características, metais pesados e pesticidas, reconhecidos como disruptores endócrinos, provocam estes efeitos pela indução de apoptose, estresse oxidativo e competição/bloqueio de receptores hormonais (Borgeest et al., 2004; Li et al., 2006; Gupta et al., 2006).

Os nossos resultados da avaliação da ciclicidade estral somada a da reserva folicular sugerem que estas alterações possam refletir em um comprometimento da ovulação, bem como alterações nos níveis circulantes de hormônios ovarianos.

Os mais importantes controladores do desenvolvimento folicular são os FSH e LH, produzidos a partir do eixo hipotalâmico hipofisiário gonadal. Substâncias químicas presentes no ar tais como HPAs, têm capacidade de se ligar aos receptores esteroides gonadais, imitando sua ação e, portanto alterando a produção destes hormônios; podendo provocar consequências adversas ao desenvolvimento e a saúde reprodutiva (Kristensen et al., 1995; Wenger et al., 2009; Han et al., 2010).

Embora a qualidade do blastocisto seja um fator importante para o processo de implantação, ela não é suficiente e requer como apresentado anteriormente um endométrio receptivo (Simon et al. 2000) para que a implantação ocorra com sucesso. Na literatura não há estudos que correlacionem exposições a poluentes atmosféricos e alterações na receptividade uterina. Nos estudos de Mohalem et al (2005) e Veras et al. (2009) apenas há sugestões de que o incremento nas taxas de perdas implantacionais possa estar associado a um comprometimento da saúde materna.

Nos roedores, a receptividade uterina é regulada primordialmente e coordenada por hormônios ovarianos, mas há evidências de que diversas moléculas (citocinas e hormônios de crescimento) modulem a ação destes hormônios (Dimitriades et al., 2005). No estado receptivo o útero está caracterizado por alterações morfológicas no epitélio luminal e no estroma, bem como na expressão de certas moléculas, tais como a inibição da expressão de mucinas (MUC-1) e aumento na expressão de LIF no epitélio

luminal e das glândulas endometriais. Entre as alterações morfológicas a diminuição na espessura do epitélio luminal e a formação dos pinopódios são essenciais para ancoragem do blastocisto. Não somente o epitélio é importante para a implantação, mas também as glândulas endometriais e suas secreções são importantes neste processo bem como na decidualização do endométrio (Gray et al. 2001).

Em nosso estudo não observamos alterações significativas na densidade de volume dos principais compartimentos uterinos: miométrio, endométrio e lúmen uterino. Ogliari et al. (2013) encontrou um resultado semelhante quando avaliou o útero de fêmeas de camundongos nulíparas expostas ao diesel durante o período de vida intrauterino e pós-natal até atingirem a maturidade sexual. As fêmeas expostas a fumaça de diesel não apresentaram diferenças na composição dos compartimentos uterinos quando comparadas as fêmeas não expostas.

Uma avaliação mais detalhada dos compartimentos uterinos em nossos animais mostrou que as fêmeas expostas à concentração de $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$ apresentam uma redução, embora não significativa, na proporção volumétrica do epitélio luminal, porém houve um aumento na quantidade de glândulas endometriais acompanhada de uma redução na porção estromal.

Um aumento na espessura do epitélio glandular, no epitélio luminal e no diâmetro glandular também foi observado. Estes resultados indicam que a exposição à poluição particulada do ar é capaz de induzir alterações morfológicas no útero, que poderiam levar a prejuízos no processo de implantação embrionária. Já nos animais expostos às maiores concentrações de ($1200\mu\text{g}/\text{m}^3$) $\text{MP}_{2,5}$ os resultados se mostram distintos. Estes animais apresentaram menor proporção glandular, e consequentemente maior proporção estromal. A espessura do endométrio está aumentada, assim como das glândulas e do diâmetro glandular quando comparado ao grupo exposto a $600\mu\text{g}/\text{m}^3$. Porém quando comparado ao grupo controle estas diferenças não foram significativas.

As glândulas endometriais estão presentes em todo o útero e seletivamente transportam e sintetizam substâncias no lúmen uterino. Em roedores estas glândulas secretam LIF, portanto, estas alterações podem interferir no estabelecimento da receptividade uterina e implantação do blastocisto.

Durante a janela implantacional, esteroides ovarianos (estrógeno) induzem a produção de citocinas, tais como o LIF, que por meio de um mecanismo autócrino/parácrino regulam a interação fisiológica materno-fetal (Cullinan et al., 1996).

Neste estudo observamos que a expressão transcricional (RNAm) de LIF não foi afetada, porém a avaliação da expressão translacional (proteica) mostrou uma redução do LIF no epitélio luminal, glandular e no estroma uterino nas fêmeas expostas às duas concentrações de MP.

Embora haja um consenso de que a expressão de mRNA está correlacionada a expressão da proteína por ele codificada, isto nem sempre ocorre (Wren et al., 2007). Diferenças na expressão de uma proteína podem ser afetadas pos-transcricionalmente por diversos fatores, incluindo a ação de micro RNAs. A expressão de um gene é regulada de diferentes maneiras e em diferentes níveis, transcricional, translacional ou influenciado pelos micro RNAs. Os micro RNAs são pequenas moléculas que atuam como silenciadores pós-transcricionais, inibindo a tradução de RNAs mensageiros-alvos. Diversos genes relacionados a fatores determinantes da receptividade uterina são sabidamente regulados pela ação de micro RNA (Altmaë et al, 2013).

Um estudo recente revelou que a exposição à exaustão de diesel é capaz de alterar a expressão de diferentes micro RNAs no sangue periférico de pacientes com asma (Yamamoto et al., 2013). Teague et al. (2009) mostraram que os micro RNAs são potentes reguladores da expressão gênica em casos de endometriose e que desempenham um papel determinante na progressão da lesão. Assim, pode ser que da mesma forma a exposição às partículas sabidamente de origem veicular também estejam

afetando a expressão pós-traslacional de LIF no endométrio dos animais deste estudo.

Nos camundongos os maiores níveis de LIF são encontrados na manhã do 4º dia gestacional após um aumento estrogênico nidatório (Chen et al. 2000). Fêmeas de camundongo *knockout* para LIF são inférteis, nestes animais os embriões desenvolvem-se até o estágio de blastocisto, mas o útero é incapaz de dar suporte a implantação. A função exata do LIF durante a janela implantacional não é conhecida, mas esta molécula parece estar envolvida na modulação do sistema imune materno e na distribuição dos leucócitos bem como na formação dos pinopódios (Schofield e Kimber 2005).

Albaghdadi e Kan (2012) mostraram que em camundongos diabéticos a maior incidência de perdas peri-implantacionais estão associadas a um expressão diminuída de LIF, ao retardo na maturação dos pinopódios e ao aumento na expressão de mucina (MUC-1).

A diminuição na expressão das proteínas de LIF pode também ser explicada pela ação de antagonistas que possivelmente podem ter se ligado aos receptores LIF beta (LIFr β) e a glicoproteína 130 (gp 130) presentes no epitélio luminal impedindo a ligação de seu agonista, reduzindo então a produção final de LIF. A ação primária dos antagonistas é evitar que os agonistas ativem os receptores. Alguns antagonistas também reduzem a atividade do receptor abaixo dos níveis basais observados na ausência do ligante (Bourne e von Zastrow, 2007).

Na superfície do epitélio luminal, o LIFr β se liga a glicoproteína GP-130 (receptor de sinalização comum para citocinas da família IL-6). O sinal de transdução pode se ativado por diversas vias, sendo a principal delas JAK/STAT. Esta sinalização pode ser inibida por supressores de citocinas ou inibidores de proteínas ativadas por proteínas STAT (Chung et al., 1997; Duval et al., 2000).

Um estudo realizado por Mohamet et al. (2009), avaliou em camundongos *knockouts* para LIF, se os efeitos de hLIF-05, um receptor antagonista de LIF, durante o início da gestação bloquearia a sinalização de

LIF causando uma redução na implantação. Para isso, um dos cornos dos animais recebeu injeções intraluminais do antagonista e no 4º dia de gestação foi observada uma redução na implantação dos embriões. A sinalização do antagonista foi confirmada pela ausência da STAT3 no epitélio luminal.

O transitório aumento de estrógeno no 4º DG tem efeitos pleiotrópicos, isto é, induz uma grande variedade de fatores de transcrição, fatores de crescimento, e mudanças na proliferação celular no estroma uterino (Cross et al., 1994). A concentração de LIF nos epitélio glandular e luminal é regulada positivamente pelo estradiol. Assim, o LIF secretado pelo epitélio glandular em resposta a um aumento nos níveis de estrógeno, liga-se a receptores no epitélio luminal ativando as vias de transdução que resultarão na transcrição e alterações conformacionais no epitélio luminal. Que por sua vez provoca a alteração na receptividade do epitélio luminal permitindo assim, que o blastocisto em justaposição invada o epitélio e o estroma subjacente. O estroma responde a invasão do blastocisto, passando a sofrer decidualização localizada no local de implantação. Portanto, a alteração a expressão transitória de LIF no útero, induzida pelo aumento dos níveis de estrógeno nidatório, no momento da implantação do embrião, é essencial para a indução de um estado de receptividade no epitélio uterino, permitindo que ocorra a implantação do blastocisto e a decidualização estromal (Chen et al., 2000).

Mas não somente o LIF determina o estado receptivo uterino. Moléculas de adesão também são importantes neste processo. As mucinas (MUC-1) são moléculas de adesão muito importantes no processo de implantação embrionária sinalizando onde o embrião deve se fixar. As mucinas são altamente expressas na superfície de células epiteliais luminas e glandulares durante o estado não receptivo, possuem propriedades anti-adesão e são reguladas por hormônios ovarianos [estrógeno] (Surveyor et al., 1995). Altos níveis de progesterona reduzem a expressão de MUC-1, facilitando as interações entre o embrião e o epitélio luminal (Surveyor et al., 1995).

Ao contrário do que esperávamos, nosso estudo mostrou que a exposição ao MP_{2,5} não provoca alterações significativas na expressão do RNAm de MUC-1 e na expressão das proteínas MUC-1, avaliadas durante o período peri-implantacional (4ºDG). No estado receptivo, estudos conduzidos em ratos e camundongos, mostraram que a MUC-1 está pouco expressa no período peri-implantacional (Braga e Gendler, 1993; Surveyor et al., 1995; DeSouza et al., 1998).

Em algumas situações patológicas, tais como diabetes e hiperglicemia materna, há uma correlação entre um aumento na expressão de MUC-1 e taxas aumentadas de perdas implantacionais devido a formação de uma barreira sobre o epitélio uterino impedindo desta forma a implantação (Braga e Gendler 1993; Surveyor et al. 1995).

Mesenguer et al. (2001) observou que a expressão de MUC-1 é regulada pela progesterona e a sua expressão aumenta durante a implantação embrionária. O embrião pouco influencia a expressão de MUC-1 nos sítios implantacionais em humanos. Em camundongos a expressão de MUC-1 desaparece durante a implantação na cavidade uterina conforme o nível de progesterona aumenta, porém ainda não se sabe se o embrião tem algum impacto sobre a expressão de MUC-1 (Braga e Glender, 1993).

Durante o processo de implantação as citocinas também parecem desempenhar um papel crítico na regulação da receptividade uterina e no desenvolvimento do embrião e na mediação do diálogo materno-fetal que sincroniza a implantação. No trato reprodutor feminino a síntese de citocinas é regulada também por hormônios esteroides ovarianos e pelo plasma seminal paterno (Robertson et al., 1992; Robertson et al., 2011).

Entre as diferentes citocinas secretadas pelas células uterinas, LIF e IL-11 são necessárias para as alterações deciduais e vasculares durante as fases iniciais da gravidez. A citocinas TGFp, GM-CSF, GCSF e IL-10 estão envolvidas na regulação da resposta imunitária materna para evitar a rejeição do embrião (Guerin et al 2009; Moldenhauer et al 2010). Por outro lado, o excesso de citocinas inflamatórias, tais como IFNG, IL-2, durante o

período peri-implantacional podem prejudicar a implantação (Chaouat et al., 1990).

Em nosso estudo, a expressão de citocinas pró-inflamatórias, IL-6 e IL-1 β , não foram diferentes entre os animais expostos ao MP_{2,5} e ao ar filtrado. A exposição em curto prazo e crônica à poluição particulada está positivamente associada com maiores níveis circulantes de IL-1 β e IL-6 (Tsai et al., 2012). Esperávamos encontrar alterações nos parâmetros inflamatórios do fluido uterino, uma vez que as citocinas são sugeridas como sendo as moléculas que orquestram a comunicação entre a mãe e o embrião.

Estudos anteriores observaram a presença de IL-1 β em células estromais (Huang et al., 2001) e IL-6 predominantemente nas células epiteliais glandulares e do lúmen (Tabibzadeh et al., 1995; Vandermolen e Gu, 1996). Ambas citocinas também são expressas no blastocisto, sugerindo um papel autócrino/parácrino no período peri-implantacional (Tovey et al., 1988; Sheth et al., 1991; Simon et al., 1993).

A avaliação do lavado uterino não mostrou diferenças na concentração de IL-1 β e IL-6. Entretanto diversos trabalhos mostram que mulheres com abortos recorrentes apresentam diferenças na expressão quando comparadas aos controles (Von Wolff et al., 2000; Inagaki et al., 2003; Hattori et al., 2007; Banerjee et al., 2013). Inagaki et al. (2003), mediram os níveis de citocinas no lavado uterino de mulheres com falhas implantacionais recorrentes após procedimentos de transferência embrionária. No grupo de mulheres que apresentavam falhas implantacionais recorrentes, foi observado um aumento significativo nos níveis de IL-1 β quando comparado ao grupo controle, sugerindo que este aumento pode ser um resultado de inflamação crônica embora os autores não tenham achado evidências histopatológicas de alterações endometriais.

Hattori et al. (2007) também observaram que a expressão de IL-6 e IL-8 no muco cervical estava aumentada em mulheres que apresentavam abortos recorrentes. No entanto, outros estudos realizados por Arslan et al. (2004) e Daher et al. (2004) não verificaram diferenças na expressão em

amostras de soro sanguíneo nos níveis de IL-6 quando comparado os casos de aborto recorrente e os controles.

Contudo, Banerjee et al. (2013) observou uma diminuição estatisticamente significativa na expressão de citocinas angiogênicas IL-2, IL-6 e IL-8 em mulheres com abortos recorrentes quando comparadas ao controle.

Diferentes estudos que investigaram os fatores uterinos associados às falhas na implantação, tanto em seres humanos e animais experimentais, demonstraram que mudanças na formação e desenvolvimento de pinopódios é uma característica comum (Achache e Revel, 2006). Nossos resultados indicam que a diminuição da formação dos pinopódios apicais nas células epiteliais luminais pode ser um dos fatores para o aumento na taxa de falhas implantacional observados em camundongos expostos cronicamente ao material particulado ambiental. Em camundongos, é durante o 5º dia gestacional que o blastocisto se fixa ao epitélio luminal por meio das membranas dos pinopódios (Fouladi-Nashta et al., 2005). Acredita-se que os pinopódios apresentam receptores para as moléculas de adesão em sua superfície facilitando assim a implantação do embrião (Achache e Revel, 2006).

Kimber et al. (2005) propôs que a falha no desenvolvimento de pinopódios em camundongos que não apresentam o gene LIF está associado a retenção anormal da espessura do glicocalix, no entanto, em nosso estudo não foram observadas diferenças na expressão transcricional e translacional de MUC-1 entre os grupos.

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dirigida para os efeitos de disruptores endócrinos na reprodução feminina e masculina (De Coster et al. 2012) e a exposição a níveis ambientais de disruptores endócrinos estão associados com menores índices gestacionais, ovulação irregular e complicações na gravidez (Fowler et al., 2012). Entre os poluentes atmosféricos constituintes, há muitas substâncias conhecidas como disruptores endócrinos tais como, cádmio, chumbo e benzo (a) pireno (Dyer, 2007).

Em nossas amostras de MP_{2,5} detectamos a presença de metais pesados, tais como vanádio, cobre, chumbo e zinco e compostos orgânicos (HPA), que são conhecidos por induzir alterações hormonais e deficiências de implantação do embrião (Watanabe et al., 1979;. Ampla, 1985) podendo assim explicar nossos achados.

7 CONCLUSÃO

Estes dados nos permite mostrar que os poluentes do ar exercem efeitos negativos significativos sobre a receptividade endometrial, afetando a diferenciação morfológica do útero e da expressão de LIF durante a janela implantacional.

Assim conclui-se que a exposição sub-crônica ao MP_{2,5} está associada a:

- Modificações ovarianas interferindo na ovogênese e no ciclo estral;
- alterações no remodelamento uterino durante a fase peri-implantacional, alterando a proporção entre o tecido glandular e estromal do endométrio;
- redução na expressão da proteína LIF (fator inibidor de leucemia);
- diminuição na formação dos pinopódios na superfície apical das células epiteliais luminais do endométrio.

8. ANEXO

Anexo A - Estatística descritiva do número de ciclos, porcentagem de dias em estro e comprimento do ciclo durante a exposição dos grupos ao MP_{2,5}/ar filtrado.

Parâmetro	Grupos	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	<i>p</i>
Nº de ciclos	Ar filtrado	8	2,13	0,64	0,23	0,008
	600 µg/m³	10	2	0,47	0,15	
	1200 µg/m³	9	2,78	0,44	0,14	
% dias em estro	Ar filtrado	8	0,45	0,13	0,04	0,06
	600 µg/m³	10	0,34	0,13	0,04	
	1200 µg/m³	9	0,33	0,07	0,02	
Comprimento do ciclo (dias)	Ar filtrado	8	6,25	2,49	0,88	0,05
	600 µg/m³	10	5,88	2,33	0,74	
	1200 µg/m³	9	4,41	0,91	0,3	

Anexo B – Valores descritivos referentes ao número total de corpos lúteos, peso dos ovários (g) e peso corporal (g) de fêmeas de camundongos Balb/C expostas ao ar filtrado, 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP_{2,5}.

Parâmetro	Grupo	N	Média	DP	EP	P
Nº Total de CL	Ar filtrado	10	9,78	4,15	1,38	0,41
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	8,60	2,72	0,86	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	10,80	3,91	1,24	
Peso dos Ovários(g)	Ar filtrado	10	0,0078	0,0018	0,0006	0,03
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	0,0078	0,0012	0,0004	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	0,0094	0,0013	0,0004	
Peso Corporal (g)	Ar filtrado	10	21,33	1,28	0,43	0,67
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	21,80	1,21	0,38	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	21,70	1,12	0,35	
Razão - peso do ovário/peso corporal	Ar filtrado	10	0,00039	0,00007	0,00002	0,07
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	0,00037	0,00004	0,00001	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	0,00044	0,00008	0,00002	

Anexo C – Valores médios referente a quantidade de folículos presente nos ovários de fêmeas de camundongos expostas ao ar filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}.

Folículos	Grupos	Média	<i>p</i>
Pequenos	Ar Filtrado	14	0,64
	600µg/m ³	15,45	
	1200µg/m ³	15,45	
Médios	Ar Filtrado	12,83	0,04
	600µg/m ³	19,6	
	1200µg/m ³	12,35	
Grandes	Ar Filtrado	16,72	0,08
	600µg/m ³	10,5	
	1200µg/m ³	17,95	
Atrésicos	Ar Filtrado	13,44	0,08
	600µg/m ³	18,15	
	1200µg/m ³	13,25	

Anexo D – Valores descritivos da densidade (%) dos compartimentos uterinos de fêmeas de camundongos expostas ao ar filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³ de MP_{2,5}.

Parâmetro	Grupos	N	Média	DP	EP	<i>p</i>
% Miométrio	Ar Filtrado	10	0,42	0,06	0,02	0,53
	600 µg/m ³	10	0,39	0,06	0,02	
	1200 µg/m ³	10	0,39	0,05	0,02	
% Endométrio	Ar Filtrado	10	0,51	0,06	0,02	0,35
	600 µg/m ³	10	0,55	0,09	0,03	
	1200 µg/m ³	10	0,55	0,06	0,02	
% Lúmen	Ar Filtrado	10	0,06	0,02	0,01	0,37
	600 µg/m ³	10	0,05	0,04	0,01	
	1200 µg/m ³	10	0,04	0,02	0,01	

Anexo E - Valores descritivo referentes à densidade e volume total (μm^3) dos compartimentos, glândulas, estroma e epitélio luminal presente no endométrio de fêmeas de camundongos expostas ao ar filtrado, $600\mu\text{g}/\text{m}^3$ e $1200\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$.

Parâmetro	Grupos	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	<i>p</i>
% Glândula	Ar Filtrado	10	0,12	0,04	0,01	0,003
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	0,17	0,06	0,02	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	0,09	0,04	0,01	
% Estroma	Ar Filtrado	10	0,77	0,03	0,01	0,04
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	0,75	0,06	0,02	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	0,81	0,04	0,01	
% Epitélio Luminal	Ar Filtrado	10	0,11	0,05	0,02	0,23
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	0,08	0,03	0,01	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	0,10	0,03	0,01	

Anexo F- Valores descritivos referentes às espessuras (μm) dos epitélios glandulares e luminal, endométrio, miométrio e diâmetro glandular durante a exposição dos grupos ao $\text{MP}_{2,5}$ / ar filtrado.

Parâmetro	Grupo	N	Média	DP	EP	<i>p</i>
Espessura epitélio glandular (μm)	Ar Filtrado	10	11,54	2,16	0,68	0,001
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	14,71	1,82	0,58	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	14,48	1,46	0,46	
Espessura endométrio (μm)	Ar Filtrado	10	340,63	78,20	24,73	0,11
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	389,79	64,67	20,45	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	401,46	49,77	15,74	
Espessura Miométrio (μm)	Ar Filtrado	10	177,74	48,46	15,33	0,44
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	191,56	45,96	14,53	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	205,56	48,31	15,28	
Espessura epitélio luminal (μm)	Ar Filtrado	10	22,33	3,80	1,20	0,03
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	27,13	5,01	1,58	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	24,00	2,62	0,83	
diâmetro glandular (μm)	Ar Filtrado	10	34,29	3,91	1,24	0,004
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	39,23	5,68	1,80	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	42,23	5,00	1,58	

Anexo G – Valores descritivos da expressão gênica de LIF e MUC-1 presente no corno uterino de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao ar filtrado, 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ e 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$.

Parâmetro	Grupo	N	Média	DP	EP	<i>p</i>
LIF	Ar Filtrado	10	0,79	0,07	0,02	0,15
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	0,86	0,17	0,05	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	0,90	0,12	0,04	
MUC-1	Ar Filtrado	10	0,99	0,006	0,003	0,63
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	1,00	0,00000	0,00000	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	0,99	0,006	0,003	

Anexo H – Valores descritivos da proporção média de área imunomarcada para LIF nos compartimentos uterinos (epitélio luminal, glândulas e estroma) nos animais expostos ao ar filtrado/MP_{2,5}.

Parâmetro	Grupos	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	<i>P</i>
% área Epitélio luminal	Ar filtrado	10	51,58	21,74	6,87	0,0002
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	25,66	11,10	3,51	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	21,88	9,12	2,88	
% área Glândulas	Ar filtrado	10	76,40	23,46	7,42	0,000002
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	30,00	17,08	5,40	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	27,88	12,35	3,91	
% área Estroma	Ar filtrado	10	10,98	5,57	1,76	0,004
	600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	5,38	4,55	1,44	
	1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$	10	4,11	2,73	0,86	

Anexo I – Valores descritivos da proporção média de área imunomarcada para MUC-1 no epitélio luminal dos animais expostos ao ar filtrado/MP_{2,5}.

Parâmetro	Grupos	N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	<i>p</i>
Média % área Epitélio luminal	Ar filtrado	10	46,64	21,33	6,75	0,51
	600 µg/m ³	10	55,26	25,07	7,93	
	1200 µg/m ³	10	45,16	14,89	4,71	

Anexo J – Valores descritivos da dosagem de Interleucinas IL-1 β e IL-6 presentes no lavado uterino de fêmeas de camundongo Balb/C expostas ao ar filtrado, 600µg/m³ e 1200µg/m³.

Parâmetro	Grupo	N	Média	DP	EP	<i>p</i>
IL-1 β	Ar Filtrado	10	42,32	28,45	9	0,8
	600 µg/m ³	10	41,89	11,96	3,78	
	1200 µg/m ³	10	37,1	13,75	4,35	
IL-6	Ar Filtrado	10	3,83	2,55	0,97	0,29
	600 µg/m ³	10	4,33	3,3	1,25	
	1200 µg/m ³	10	2,29	1,56	0,55	

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbondanzo SJ, Cullinan EB, McIntyre K, Labow MA, Stewart CL. Reproduction in mice lacking a functional type 1 IL-1 receptor. *Endocrinology*. 1996;Aug;137(8):3598-601.

Achache H, Revel A. 2006. Endometrial receptivity markers, the journey to successful embryo implantation. *Hum Reprod Update* 12(6):731-46.

Acosta AA, Elberger L, Borghi M, Calamera JC, Chemes H, Doncel GF, Kliman H, Lema B, Lustig L, Papier S.. Endometrial dating and determination of the window of implantation in healthy fertile women. *Fertil Steril*. 2000;73:788–798.

Adesanya OO, Zhou J, Samathanam C, Powell-Braxton L, Bondy CA. Insulin-like growth factor 1 is required for G2 progression in the estradiol-induced mitotic cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;Mar16;96(6):3287-91.

Albaghdadi AJ, Kan FW. 2012. Endometrial receptivity defects and impaired implantation in diabetic NOD mice. *Biol Reprod* 2;87(2):30.

Altmäe S, Martinez-Conejero JA, Esteban FJ, Ruiz-Alonso M, Stavreus-Evers A, Horcajadas JA, Salumets A. MicroRNAs miR-30b, miR-30d, and miR-494 regulate human endometrial receptivity. *Reprod Sci*. 2013 Mar;20(3):308-17.

American Veterinary Medical Association. 2013. Guideline Euthanasia of Animals. Available at: <https://www.avma.org/KB/Policies/Documents/euthanasia.pdf> [accessed 10 january 2013].

Andrade SJ. Investigação sobre a composição química e avaliação da mutagenicidade do material particulado atmosférico sob a influência da fuligem da queima de cana-de-açúcar. [tese de doutorado]. Araraquara: Instituto de Química/UNESP; 2004.

Aoki R, Fukuda MN. Recent molecular approaches to elucidate the mechanism of embryo implantation: trophinin, bystin, and tastin as molecules involved in the initial attachment of blastocysts to the uterus in humans. *Semin Reprod Med*. 2000;18(3):265-71.

Aplin JD, Kimber SJ. Trophoblast-uterine interactions at implantation. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:48.

Aplin JD. The cell biological basis of human implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2000;14(5):757-64.

Arici A, Engin O, Attar E, Olive DL. Modulation of leukemia inhibitory factor gene expression and protein biosynthesis in human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*. 1995; Jun;80(6):1908-15.

Arslan E, Colakoğlu M, Celik C, Gezginç K, Acar A, Capar M, Aköz M, Akyürek C. Serum TNF-alpha, IL-6, lupus anticoagulant and anticardiolipin antibody in women with and without a past history of recurrent miscarriage. *Arch Gynecol Obstet*. 2004 Dec;270(4):227-9.

Bachmann J. Will the circle be unbroken: a history of the U.S. National Ambient Air Quality Standards. *J Air Waste Manag Assoc*. 2007;jun;57(6):652-97.

Backes CH, Nelin T, Gorr MW, Wold LE. 2013. Early life exposure to air pollution: how bad is it? *Toxicol Lett* 10;216(1):47-53.

Baligar PN, Kaliwal BB. Reproductive toxicity of carbofuran to the female mice: effects on estrous cycle and follicles. *Ind Health*. 2002 Oct;40(4):345-52.

Banerjee P, Jana SK, Pasricha P, Ghosh S, Chakravarty B, Chaudhury K. Proinflammatory cytokines induced altered expression of cyclooxygenase-2 gene results in unreceptive endometrium in women with idiopathic recurrent spontaneous miscarriage. *Fertil Steril*. 2013 Jan;99(1):179-87.

Bedeschi E, Campari C, Candela S, Collini G, Caranci N, Frasca G, Galassi C, Francesca G, Vigotti MA. Urban air pollution and respiratory emergency visits at pediatric unit, Reggio Emilia, Italy. *J Toxicol Environ Health A*. 2007;70(3-4):261-5.

Bell ML, Belanger K, Ebisu K, Gent JF, Lee HJ, Koutrakis P, Leaderer BP. Prenatal exposure to fine particulate matter and birth weight: variations by particulate constituents and sources. *Epidemiology*. 2010;Nov;21(6):884-91.

Bell ML, Davis DL. Reassessment of the lethal London fog of 1952: novel indicators of acute and chronic consequences of acute exposure to air pollution. *Environ Health Perspect*. 2001 Jun;109(3):389-94.

Bentin-Ley U, Lopata A. In vitro models of human blastocyst implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2000;14:765-774.

Bhatt H, Brunet LJ, Stewart CL. Uterine expression of leukemia inhibitory factor coincides with the onset of blastocyst implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(24):11408-12.

Bobak M. Outdoor air pollution, low birth weight, and prematurity. *Environ Health Perspect*. 2000;108(2):173-6.

Bobak M; Leon DA. The effect of air pollution on infant mortality appears specific for respiratory causes in the postneonatal period. *Epidemiology*. 1999;10:666-670.

Borgeest C, Miller KP, Gupta R, Greenfeld C, Hruska KS, Hoyer P, Flaws JA. Methoxychlor-induced atresia in the mouse involves Bcl-2 family members, but not gonadotropins or estradiol. *Biol Reprod*. 2004 Jun;70(6):1828-35.

Bourne HR, von Zastrow M. Receptores de fármaco e farmacodinâmica. In: Katzung BG. *Farmacologia básica e clínica*. 10a ed. São Paulo: Artmed; 2007. p.11-30.

Braga VM, Gendler SJ. Modulation of Muc-1 mucin expression in the mouse uterus during the estrus cycle, early pregnancy and placentation. *J Cell Sci*. 1993 Jun;105 (Pt 2):397-405.

Brook JR, Poirot RL, Dann TF, Lee PK, Lillyman CD, Ip T. Assessing sources of PM_{2.5} in cities influenced by regional transport. *J Toxicol Environ Health A*. 2007;70(3-4):191-9.

Carreras HA, Rodriguez JH, Gonzalez CM, Wannaz ED, Ferreyra FG, Perez CA, Pignata, ML. Assessment of the relationship between total suspended particles and the response of two biological indicators transplanted to an urban area in central Argentina. *Atmospheric Environment* 2009; 43, 2944-2949.

Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. Embryo implantation. *Dev Biol*. 2000;223(2):217-37.

Carvalho HF, Recco-Pimentel SM. *A célula* 2001. São Paulo: Ed. Manole, 2001. 283p.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Material particulado inalável fino (MP_{2,5}) e grosso (MP_{2,5} – 10) na atmosfera da Região Metropolitana de São Paulo – 2008. Cetesb, 29p.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo – 2010. Cetesb, 237p.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Revisão dos padrões de qualidade do ar e aprimoramento da gestão integrada da qualidade do ar no estado de São Paulo – 2010. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/institucional/tecnologia-ambiental/86-gt>. Acesso em: 14/05/2012.

Chaouat G, Menu E, Clark DA, Dy M, Minkowski M, Wegmann TG. 1990. Control of fetal survival in CBA x DBA/2 mice by lymphokine therapy. *J Reprod Fertil* 89:447–458.

Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 2004; 25:103-113.

Chen DB, Hilsenrath R, Yang ZM, Le SP, Kim SR, Chuong CJ, Poindexter AN 3rd, Harper MJ. Leukaemia inhibitory factor in human endometrium during the menstrual cycle: cellular origin and action on production of glandular epithelial cell prostaglandin in vitro. *Hum Reprod*. 1995 Apr;10(4):911-8.

Chen JR, Cheng JG, Shatzer T, Sewell L, Hernandez L, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor can substitute for nidatory estrogen and is essential to inducing a receptive uterus for implantation but is not essential for subsequent embryogenesis. *Endocrinology*. 2000;Dec;141(12):4365-72.

Cheng JG, Rodriguez CI, Stewart CL. Control of uterine receptivity and embryo implantation by steroid hormone regulation of LIF production and LIF receptor activity: towards a molecular understanding of "the window of implantation". *Rev Endocr Metab Disord*. 2002;May;3(2):119-26.

Chomczynski, P, Sacchi, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162:156-159.

Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*. 1997 Dec 5;278(5344):1803-5.

Ciocco A, Thompson DJ. A follow-up of Donora ten years after: methodology and findings. *Am J Public Health Nations Health*. 1961;Feb;51:155-64.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 03 de 28.06.1990. Estabelece padrões para a qualidade do ar. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 20.08.1990. Disponível em: <http://www.pda.ufpr.br/portal/legislacoes/006.pdf>

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 18 de 06.05.1986. Resoluções. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res1886.html>

Cornillie FJ, Lauweryns JM. Phagocytotic and iron-storing capacities of stromal cells in the rat endometrium. A histochemical and ultrastructural study. *Cell Tissue Res*. 1985;239(3):467-76.

Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*. 1994 Dec 2;266(5190):1508-18.

Cullinan EB, Abbondanzo SJ, Anderson PS, Pollard JW, Lessey BA, Stewart CL. Leukemia inhibitory factor (LIF) and LIF receptor expression in human endometrium suggests a potential autocrine/paracrine function in regulating embryo implantation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(7):3115-20.

Cummings AM, Perreault SD. Methoxychlor accelerates embryo transport through the rat reproductive tract. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1990;102(1):110-6.

Curtis SW, Washburn T, Sewall C, DiAugustine R, Lindzey J, Couse JF, Korach KS. Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(22):12626-30.

Daher S, de Arruda Gerald, Denardi K, Blotta MH, Mamoni RL, Reck AP, Camano L, Mattar R. Cytokines in recurrent pregnancy loss. *J Reprod Immunol*. 2004 Jun;62(1-2):151-7.

Darrow LA, Klein M, Flanders WD, Waller LA, Correa A, Marcus M, Mulholland JA, Russell AG, Tolbert PE. Ambient air pollution and preterm birth: a time-series analysis. *Epidemiology*. 2009;Sep;20(5):689-98.

Das RM, Martin L. Progesterone inhibition of mouse uterine epithelial proliferation. *J Endocrinol*. 1973;Oct;59(1):205-6.

Davis BJ, Maronpot RR, Heindel JJ. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1994 Oct;128(2):216-23.

De Coster S, van Larebeke N. 2012. Endocrine-disrupting chemicals: associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health* 2012:713696.

de Feo, V. J. (). Decidualization. In *Cellular Biology of the Uterus*. (R. M. Wynn, Ed.). Appleton-Century-Crofts/Meredith, New York. 1967. pp. 191-290.

de Kok TM, Driessens HA, Hogervorst JG, Briedé JJ. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: a review of recent studies. *Mutat Res*. 2006;613(2-3):103-22.

Dejmek J, Jelínek R, Solansky' I, Benes I, Srám RJ. Fecundability and parental exposure to ambient sulfur dioxide. *Environ Health Perspect*. 2000;108(7):647-54.

Dejmek J, Selevan SG, Benes I, Solanský I, Srám RJ. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. *Environ Health Perspect*. 1999;107(6):475-80.

Denker HW. Implantation: a cell biological paradox. *J Exp Zool*. 1993; 266(6):541-58.

DeSouza MM, Mani SK, Julian J, Carson DD. Reduction of mucin-1 expression during the receptive phase in the rat uterus. *Biol Reprod*. 1998 Jun;58(6):1503-7.

Develioglou OH, Nikas G, Hsiu JG, Toner JP, Jones HW Jr. Detection of endometrial pinopódios by light microscopy. *Fertil Steril* 2000;74:767–770.

Dey SK, Lim H, Das SK, Reese J, Paria BC, Daikoku T, Wang H. Molecular cues to implantation. *Endocr Rev*. 2004 Jun;25(3):341-73.

Dimitriadis E, White CA, Jones RL, Salamonsen LA. 2005. Cytokines, chemokines and growth factors in endometrium related to implantation. *Hum Reprod Update* 11(6):613-30.

Dockery P, Li TC, Rogers AW, Cooke ID, Lenton EA. The ultrastructure of the glandular epithelium in the timed endometrial biopsy. *Hum Reprod*. 1988;Oct;3(7):826-34.

Dockery P, Rogers AW. The effects of steroids on the fine structure of the endometrium. *Baillieres Clin Obstet Gynaecol*. 1989 Jun;3(2):227-48.

Dockery P, Warren MA, Li TC, Rogers AW, Cooke ID, Mundy J. A morphometric study of the human endometrial stroma during the peri-implantation period. *Hum Reprod.* 1990;Jul;5(5):494-8.

Dreher KL, Jaskot RH, Lehmann JR, Richards JH, McGee JK, Ghio AJ, Costa DL. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. *J Toxicol Environ Health.* 1997;50(3):285-305.

Duval D, Reinhardt B, Keding C, Boeuf H. Role of suppressors of cytokine signaling (Socs) in leukemia inhibitory factor (LIF) -dependent embryonic stem cell survival. *FASEB J.* 2000 Aug;14(11):1577-84.

Dyer CA. Heavy metals as endocrine disrupting chemicals. In: Gore AC. *Endocrine-Disrupting Chemicals: From Basic Research to Clinical Practice.* Totowa, NJ:Humana Press, 2007. 361 pp.

Enders AC, Nelson DM. Pinocytotic activity of the uterus of the rat. *Am J Anat* 1973;138:277-299.

Enders CA, Schlafke S. A morphological analysis of the early implantation stages in the rat. *Am J Anat.* 1967;Mar;120(2):185-225.

Fernvik E, Scharnweber T, Knopp D, Niessner R, Vargaftig BB, Peltre G. Effects of fractions of traffic particulate matter on TH2-cytokines, IgE levels, and bronchial hyperresponsiveness in mice. *J Toxicol Environ Health A.* 2002;65(15):1025-45.

Figueiredo CC, Resck DVS, Gomes AC, Ferreira EAB, Ramos MLG. Carbono e nitrogênio da biomassa microbiana em resposta a diferentes sistemas de manejo em um Latossolo Vermelho no Cerrado. *R. Bras. Ci. Solo.* 2007; 31:551-562.

Filant J, Spencer TE. Endometrial glands are essential for blastocyst implantation and decidualization in the mouse uterus. *Biol Reprod.* 2013 Apr 11;88(4):93. doi: 10.1095/biolreprod.113.107631. Print 2013.

Finn CA, Martin L. Hormone secretion during early pregnancy in the mouse. *J Endocrinol.* 1969;45(1):57-65.

Finn CA, Martin L. The role of the oestrogen secreted before oestrus in the preparation of the uterus for implantation in the mouse. *J Endocrinol.* 1970;47(4):431-8.

Firket J. Fog along the Meuse Valley. *Trans Faraday Soc.* 1936;32:1192-1197.

Fouladi Nashta AA, Andreu CV, Nijjar N, Heath JK, Kimber SJ. Role of leukemia inhibitor factor (LIF) in decidualisation of murine uterine stromal cells in vitro. *J Endocrinol.* 2004;Jun;181(3):477-92.

Fouladi-Nashta AA, Jones CJ, Nijjar N, Mohamet L, Smith A, Chambers I, Kimber SJ. Characterization of the uterine phenotype during the peri-implantation period for LIF-null, MF1 strain mice. *Dev Biol.* 2005;May1;281(1):1-21.

Fowler PA, Bellingham M, Sinclair KD, Evans NP, Pocar P, Fischer B, et al. 2012. Impact of endocrine-disrupting compounds (EDCs) on female reproductive health. *Mol Cell Endocrinol* 22;355(2):231-9.

Friedrich ER. Effects of contraceptive hormone preparations on the fine structure of the endometrium. *Obstet Gynecol* 1967;30:201-219.

Fukuda M, Azuma C, Kanai T, Koyama M, Kimura T, Saji F. Interleukin-1 receptor antagonist expression in epithelial cells of human endometrium. *Int J Gynaecol Obstet.* 1995 Jun;49(3):305-10.

Glinianaia SV, Rankin J, Bell R, Pless-Mulloli T, Howel D. Particulate air pollution and fetal health: a systematic review of the epidemiologic evidence. *Epidemiology.* 2004;15(1):36-45.

Glorennec P, Monroux F. Health impact assessment of PM10 exposure in the city of Caen, France. *J Toxicol Environ Health A.* 2007;Feb;1;70(3-4):359-64.

Gouveia N, Bremner SA, Novaes HM. Association between ambient air pollution and birth weight in São Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health.* 2004;58(1):11-7.

Gray CA, Bartol FF, Tarleton BJ, Wiley AA, Johnson GA, Bazer FW, et al. 2001a. Developmental biology of uterine glands. *Biol Reprod* 65: 1311-1323.

Gu ZW, Keane MJ, Ong TM, Wallace WE. Diesel exhaust particulate matter dispersed in a phospholipid surfactant induces chromosomal aberrations and micronuclei but not 6-thioguanine-resistant gene mutation in V79 cells. *J Toxicol Environ Health A.* 2005; 68(6):431-44.

Guerin LR, Prins JR, Robertson SA. 2009. Regulatory T-cells and immune tolerance in pregnancy: a new target for infertility treatment? *Hum Reprod Update* 15:517–535.

Gupta RK, Miller KP, Babus JK, Flaws JA. Methoxychlor inhibits growth and induces atresia of antral follicles through an oxidative stress pathway. *Toxicol Sci.* 2006 Oct;93(2):382-9.

Gupta RK, Aberdeen G, Babus JK, Albrecht ED, Flaws JA. Methoxychlor and its metabolites inhibit growth and induce atresia of baboon antral follicles. *Toxicol Pathol.* 2007 Aug;35(5):649-56.

Guttenberg I. Plasma levels of "free" progesterone during the estrous cycle in the mouse. *Endocrinology.* 1961;Jun;68:1006-9.

Guyton AC, Hall JE. Textbook of medical physiology. 12th ed. Philadelphia: Elsevier; 2011.

Ha EH, Hong YC, Lee BE, Woo BH, Schwartz J, Christiani DC. Is air pollution a risk factor for low birth weight in Seoul? *Epidemiology.* 2001;12(6):643-8.

Haines BP, Voyle RB, Rathjen PD. Intracellular and extracellular leukemia inhibitory factor proteins have different cellular activities that are mediated by distinct protein motifs. *Mol Biol Cell.* 2000;Apr;11(4):1369-83.

Hambartsumian, E. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am. J. Reprod. Immunol.* 1998; 39,137–143.

Hammoud A, Carrell DT, Gibson M, Sanderson M, Parker-Jones K, Peterson CM. Decreased sperm motility is associated with air pollution in Salt Lake City. *Fertil Steril.* 2010;Apr;93(6):1875-9.

Han Y, Xia Y, Zhu P, Qiao S, Zhao R, Jin N, Wang S, Song L, Fu G, Wang X. Reproductive hormones in relation to polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) metabolites among non-occupational exposure of males. *Sci Total Environ.* 2010 Jan 15;408(4):768-73.

Hana V, Murphy LJ. Interdependence of epidermal growth factor and insulin-like growth factor-I expression in the mouse uterus. *Endocrinology.* 1994;Jul;135(1):107-12.

Hansen C, Luben TJ, Sacks JD, Olshan A, Jeffay S, Strader L, Perreault SD. The effect of ambient air pollution on sperm quality. *Environ Health Perspect.* 2010;Feb;118(2):203-9.

Hansen C, Neller A, Williams G, Simpson R. Maternal exposure to low levels of ambient air pollution and preterm birth in Brisbane, Australia. *BJOG.* 2006; Aug;113(8):935-41.

Hattori Y, Nakanishi T, Ozaki Y, Nozawa K, Sato T, Sugiura-Ogasawara M. Uterine cervical inflammatory cytokines, interleukin-6 and -8, as predictors of miscarriage in recurrent cases. *Am J Reprod Immunol.* 2007 Oct;58(4):350-7.

Hauser R, Sokol R. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult male. *Fertil Steril.* 2008 Feb;89(2 Suppl):e59-65

Helfand WH, Lazarus J, Theerman P. Donora, Pennsylvania: an environmental disaster of the 20th century. *Am J Public Health.* 2001;Apr;91(4):553.

Hey NA, Graham RA, Seif MW, Aplin JD. The polymorphic epithelial mucin MUC1 in human endometrium is regulated with maximal expression in the implantation phase. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994;78(2):337-42.

Hilkens J, Ligtenberg MJ, Vos HL, Litvinov SV. Cell membrane-associated mucins and their adhesion-modulating property. *Trends Biochem Sci.* 1992 Sep;17(9):359-63.

Hirzel DJ, Wang J, Das SK, Dey SK, Mead RA. Changes in uterine expression of leukemia inhibitory factor during pregnancy in the Western spotted skunk. *Biol Reprod.* 1999;60(2):484-92.

Hogervorst JG, de Kok TM, Briedé JJ, Wesseling G, Kleinjans JC, van Schayck CP. Relationship between radical generation by urban ambient particulate matter and pulmonary function of school children. *J Toxicol Environ Health A.* 2006;69(3-4):245-62.

Homan GF, Davies M, Norman R. The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Hum Reprod Update.* 2007 May-Jun;13(3):209-23.

Hood, RD. Developmental and reproductive toxicology; a practical approach, 2ed. CRC Press. 2006:1149p.

Howard CV, Reed MG. Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy. 2nd ed. Abingdon, Oxon: Garland Science/Bios Scientific. 2005:103-117.

Hoyer PB, Sipes IG. Assessment of follicle destruction in chemical-induced ovarian toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;36:307-31.

Huang HY, Wen Y, Krüessel JS, Raga F, Soong YK & Polan ML () Interleukin-1 (IL-1) regulation of IL-1 beta and IL-1 receptor antagonist expression in cultured human endometrial stroma cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:1387-1393.

Huynh M, Woodruff TJ, Parker JD, Schoendorf KC. Relationships between air pollution and preterm birth in California. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 2006 Nov;20(6):454-61

Ignar-Trowbridge DM, Nelson KG, Bidwell MC, Curtis SW, Washburn TF, McLachlan JA, Korach KS. Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(10):4658-62.

Inagaki N, Stern C, McBain J, Lopata A, Kornman L, Wilkinson D. Analysis of intra-uterine cytokine concentration and matrix-metalloproteinase activity in women with recurrent failed embryo transfer. *Hum Reprod.* 2003 Mar;18(3):608-15.

INAIIRA. Instituto Nacional de Análise Integrada de Risco Ambiental. Disponível em: <http://www.inaira.org/br/intoxicacao/concentrador.shtml>. Acesso em: 25/03/2010.

Itskovitz J, Hodgen GD. Endocrine basis for the initiation, maintenance and termination of pregnancy in humans. *Psychoneuroendocrinology.* 1988;13(1-2):155-70.

Jacobson MZ. Atmospheric pollution: history, science, and regulation. New York: Cambridge University Press; 2002. 399p.

Januário DA, Perin PM, Maluf M, Lichtenfels AJ, Nascimento Saldiva PH. 2010. Biological effects and dose-response assessment of diesel exhaust particles on in vitro early embryo development in mice. *Toxicol Sci* 117(1):200-8.

Johannisson E, Nilsson L. Scanning electron microscopic study of the human endometrium. *Fertil Steril* 1972;23:613-625.

Junqueira LC, Junqueira LM. Técnicas básicas de citologia e histologia. São Paulo: Ed. Santos. 1983.

Kabir-Salmani M, Nikzad H, Shiokawa S, Akimoto Y, Iwashita M. Secretory role for human uterodomes (pinopods): secretion of LIF. *Mol Hum Reprod.* 2005 Aug;11(8):553-9.

Kaiser R, Romieu I, Medina S, Schwartz J, Krzyzanowski M, Künzli N. Air pollution attributable postneonatal infant mortality in U.S. metropolitan areas: a risk assessment study. *Environ Health.* 2004;3(1):4.

Kampas M, Castanas E. Human health effects of air pollution. *Environmental Pollution* 2008; 151: 362-367.

Kannan S, Misra DP, Dvonch JT, Krishnakumar A. Exposures to airborne particulate matter and adverse perinatal outcomes: a biologically plausible mechanistic framework for exploring potential. *Cien Saude Colet.* 2007;12(6):1591-602.

Kimber SJ, Spanswick C. Blastocyst implantation: the adhesion cascade. *Semin Cell Dev Biol.* 2000;11(2):77-92.

Kimber SJ. 2005. Leukaemia inhibitory factor in implantation and uterine biology. *Reproduction* 130(2):131-45.

Krewski D, Rainham D. Ambient air pollution and population health: overview. *J Toxicol Environ Health A.* 2007;70(3-4):275-83.

Kristensen P, Eilertsen E, Einarsdóttir E, Haugen A, Skaug V, Ovrebo S. Fertility in mice after prenatal exposure to benzo[a]pyrene and inorganic lead. *Environ Health Perspect.* 1995 Jun;103(6):588-90.

Lacasaña M, Esplugues A, Ballester F. Exposure to ambient air pollution and prenatal and early childhood health effects. *Eur J Epidemiol.* 2005;20(2):183-99.

Laird SM, Tuckerman E, Li TC, Bolton AE. Stimulation of human endometrial epithelial cell interleukin 6 production by interleukin 1 and placental protein 14. *Hum Reprod.* 1994 Jul;9(7):1339-43.

Lass A, Weiser W, Munafo A & Loumaye E 2001 Leukemia inhibitory factor in human reproduction. *Fertility and Sterility* 76 1091–1096.

Lédée-Bataille N, Laprée-Delage G, Taupin JL, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. Concentration of leukaemia inhibitory factor (LIF) in uterine flushing fluid is highly predictive of embryo implantation. *Hum Reprod.* 2002;Jan;17(1):213-8.

Lee DS, Yanagimoto Ueta Y, Xuan X, Igarashi I, Fujisaki K, Sugimoto C, Toyoda Y, Suzuki H. Expression patterns of the implantation-associated genes in the uterus during the estrous cycle in mice. *J Reprod Dev.* 2005 Dec;51(6):787-98.

Lessey BA, Damjanovich L, Coutifaris C, Castelbaum A, Albelda SM, Buck CA. Integrin adhesion molecules in the human endometrium. Correlation with the normal and abnormal menstrual cycle. *J Clin Invest.* 1992;90(1):188-95.

Li X, Zhang S, Safe S. Activation of kinase pathways in MCF-7 cells by 17beta estradiol and structurally diverse estrogenic compounds. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2006 Feb;98(2-3):122-32.

Lichtenfels AJ, Gomes JB, Pieri PC, El Khouri Miraglia SG, Hallak J, Saldiva PH. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil. *Fertil Steril.* 2007;87(1):230-2.

Lin CA, Pereira LA, Nishioka DC, Conceição GM, Braga AL, Saldiva PH. Air pollution and neonatal deaths in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 7(5):765-70.

Ljungkvist I, Nilsson O. Ultrastructure of rat uterine luminal epithelium at functional states compatible with implantation. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 1971;135(1):101-7.

Ljungkvist I. Attachment reaction of rat uterine luminal epithelium. I. Gross and fine structure of the endometrium of the spayed, virgin rat. *Acta Soc Med Ups.* 1971;76(3-4):91-109.

Lopata A, Bentin-Ley U, Enders A. 'Pinopodes' and implantation. *Rev Endocr Metab Disord.* 2002;3:77–86.

Lovekamp-Swan T, Davis BJ. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect.* 2003 Feb;111(2):139-45.

Lovekamp-Swan T, Jetten AM, Davis BJ. Dual activation of PPARalpha and PPARgamma by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2003 Mar 28;201(1-2):133-41.

Maisonet M, Bush TJ, Correa A, Jaakkola JJ. Relation between ambient air pollution and low birth weight in the Northeastern United States. *Environ Health Perspect.* 2001;109(3):351-6.

Mamatsashvili, MI. Detrimental effect of carbon monoxide and sulfur dioxide on fertility of female rats. *Hyg Sanit.* 1970; 35(4-6): 277-279.

Mannes T, Jalaludin B, Morgan G, Lincoln D, Sheppard V, Corbett S. Impact of ambient air pollution on birth weight in Sydney, Australia. *Occup Environ Med.* 2005;62(8):524-30.

Martel D, Monier MN, Roche D, Psychoyos A. Hormonal dependence of pinopode formation at the uterine luminal surface. *Hum Reprod.* 1991;Apr;6(4):597-603.

Martin L, Finn CA. Interactions of oestradiol and progestins in the mouse uterus. *J Endocrinol.* 1970;Sep;48(1):109-15.

Mattison DR, Thomford PJ. The mechanisms of action of reproductive toxicants. *Toxicol Pathol.* 1989;17(2):364-76.

Mayhew TM. Stereology and the placenta: where's the point? - a review. *Placenta.* 2006;27 Suppl A:S17-25.

Meseguer M, Aplin JD, Caballero-Campo P, O'Connor JE, Martín JC, Remohí J, Pellicer A, Simón C. Human endometrial mucin MUC1 is up-regulated by progesterone and down-regulated in vitro by the human blastocyst. *Biol Reprod.* 2001;Feb;64(2):590-601.

Miller KP, Borgeest C, Greenfeld C, Tomic D, Flaws JA. In utero effects of chemicals on reproductive tissues in females. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004 Jul 15;198(2):111-31.

Mohallem SV, de Araujo Lobo DJ, Pesquero CR, Assunção JV, de André PA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of São Paulo. *Environ Res.* 2005;98(2):196-202.

Mohamet L, Heath JK, Kimber SJ. Determining the LIF-sensitive period for implantation using a LIF-receptor antagonist. *Reproduction.* 2009 Nov;138(5):827-36.

Mohorovic L. First two months of pregnancy--critical time for preterm delivery and low birthweight caused by adverse effects of coal combustion toxics. *Early Hum Dev.* 2004;Nov;80(2):115-23.

Moldenhauer LM, Keenihan SN, Hayball JD, Robertson SA. 2010. GM-CSF is an essential regulator of T cell activation competence in uterine dendritic cells during early pregnancy in mice. *J Immunol* 185:7085–7096.

Monaci, F., Moni, F., Lanciotti, E., Grechi, D., Barglagi, R. Bio-monitoring of airborne metals in urban environments: new tracers of vehicle emission, in place of lead. *Environmental Pollution.* 2000; 107(3), 321-32.

Montes GS, Alonso CR, Hutter JC, Montoro LS, Rodriguez DA. Investigações relacionadas com as transferências embrionárias em ratas: I, Colpocitologia exfoliativa. *Gaceta Vet.* 1978; 329.

Morrissey RE, Lamb JC 4th, Schwetz BA, Teague JL, Morris RW. Association of sperm, vaginal cytology, and reproductive organ weight data with results of continuous breeding reproduction studies in Swiss (CD-1) mice. *Fundam Appl Toxicol.* 1988a;11(2):359-71.

Morrissey RE, Schwetz BA, Lamb JC 4th, Ross MD, Teague JL, Morris RW. Evaluation of rodent sperm, vaginal cytology, and reproductive organ weight data from National Toxicology Program 13-week studies. *Fundam Appl Toxicol.* 1988b;11(2):343-58.

Moulton BC, Koenig BB. Uterine deoxyribonucleic acid synthesis during preimplantation in precursors of stromal cell differentiation during decidualization. *Endocrinology.* 1984;Oct;115(4):1302-7.

Murphy CR. Understanding the apical surface markers of uterine receptivity: pinopods-or uterodomes? *Hum Reprod* 2000;15:2451–2454.

Navot D, Bergh PA, Williams M, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, Fox J, Schreiner-Engel P, Hofmann GE, Grunfeld L. An insight into early reproductive processes through the in vivo model of ovum donation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1991;72(2):408-14.

Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod.* 1982;27(2):327-39.

Nemery B, Hoet PH, Nemmar A. The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. *Lancet.* 2001;Mar;3;357(9257):704-8.

Nikas G, Drakakis P, Loutradis D, Mara-Skoufari C, Koumantakis E, Michalas S, Psychoyos A. Uterine pinopodes as markers of the 'nidation window' in cycling women receiving exogenous oestradiol and progesterone. *Hum Reprod.* 1995; 0:1208–1213.

Nikas G, Makrigiannakis A, Hovatta O, Jones HW Jr. Surface morphology of the human endometrium. Basic and clinical aspects. *Ann N Y Acad Sci* 2000;900:316–324.

Nikas G, Psychoyos A. Uterine pinopodes in peri-implantation human endometrium. Clinical relevance. *Ann N Y Acad Sci* 1997;816:129–142.

Nikas G. Pinopodes as markers of endometrial receptivity in clinical practice. *Hum Reprod.* 1999;Dec;14(2):99-106.

Nilsson O. Structural differentiation of luminal membrane in rat uterus during normal and experimental implantations. *Z Anat Entwicklungsgesch* 1966;125:152–159.

Nilsson O. Ultrastructure of mouse uterine surface epithelium under different estrogenic influences. 2. Early effect of estrogen administered to spayed animals. *J Ultrastruct Res.* 1958;2:73–95.

Nilsson O. Ultrastructure of the process of secretion in the rat uterine epithelium at preimplantation. *J Ultrastruct Res.* 1972;40:572–580.

Norwitz ER, Schust DJ, Fisher SJ. Implantation and the survival of early pregnancy. *N Engl J Med.* 2001 Nov 8;345(19):1400-8.

Ogliari KS, de Faria Coimbra Lichtenfels AJ, Rodrigues de Marchi MR, Ferreira AT, Dolhnikoff M, Saldiva PH. Intrauterine exposure to diesel exhaust diminishes adult ovarian reserve. *Fertil Steril.* 2013 Feb 15. pii: S0015-0282(13)00159-3.

Osmond C, Barker DJ. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect.* 2000; 108 Suppl 3:545-53.

Padykula HA, Coles LG, Okulicz WC, Rapaport SI, McCracken JA, King NW Jr, Longcope C, Kaiserman-Abramof IR. The basalis of the primate endometrium: a bifunctional germinal compartment. *Biol Reprod.* 1989;Mar;40(3):681-90.

Parimala MD, Kaliwal BB. Dose-dependent estrous cycle, ovarian follicles and biochemical contents reversal in albino mice after exposure to Mancozeb. *Caspian J. Env. Sci.* 2005; 3(2):118-131.

Parker JD, Woodruff TJ, Basu R, Schoendorf KC. Air pollution and birth weight among term infants in California. *Pediatrics.* 2005;115(1):121-8.

Parr MB, Parr EL. Endocytosis in the uterine epithelium of the mouse. *J Reprod Fertil.* 1977;50:151–153

Parr MB, Parr EL. Uterine luminal epithelium: protrusions mediate endocytosis, not apocrine secretion, in the rat. *Biol Reprod.* 1974;11:220–233.

Pereira LA, Loomis D, Conceição GM, Braga AL, Arcas RM, Kishi HS, Singer JM, Böhm GM, Saldiva PH. Association between air pollution and intrauterine mortality in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect.* 1998;106(6):325-9.

Perin PM, Maluf M, Czeresnia CE, Nicolosi Foltran Januário DA, Nascimento Saldiva PH. Effects of exposure to high levels of particulate air pollution during the follicular phase of the conception cycle on pregnancy outcome in couples undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. *Fertil Steril.* 2010;93(1):301-3.

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001 May 1;29(9):e45.

Piquet-Pellorce C, Grey L, Mereau A, Heath JK. Are LIF and related cytokines functionally equivalent? *Exp Cell Res.* 1994;Aug;213(2):340-7.

Psychoyos A, Mandon P. Study of the surface of the uterine epithelium by scanning electron microscope. Observations in the rat at the 4th and 5th day of pregnancy. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D.* 1971; 272: 2723–2725.

Psychoyos A. Uterine receptivity for nidation. *Ann N Y Acad Sci.* 1986;476:36-42.

Quinn C, Ryan E, Claessens EA, Greenblatt E, Hawrylyshyn P, Cruickshank B, Hannam T, Dunk C, Casper RF. The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window. *Fertil Steril.* 2007a;May;87(5):1015-21.

Quinn CE, Casper RF. Pinopodes: a questionable role in endometrial receptivity. *Hum Reprod Update.* 2009;Mar-Apr;15(2):229-36.

Quinn CE, Detmar J, Casper RF. Pinopodes are present in *Lif* null and *Hoxa10* null mice. *Fertil Steril.* 2007b;88(4):1021–1028.

Rao MC, Gibori G. Corpus luteum: animal models of possible relevance to reproductive toxicology. *Reprod Toxicol.* 1987;1(1):61-9.

Rendi MH, Muehlenbachs A, Garcia RL, Boyd KB. Female reproductive system. In: *Comparative anatomy and histology: A mouse and human atlas.* London: Elsevier; 2012.p.253-84.

Ré-Poppi, N, Santiago-Silva, MR. Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons and methoxylated phenols in wood smoke emitted during production of charcoal. *Chromatographia.* 2002. April 55(7-8): 475-481.

Ritz B, Wilhelm M, Hoggatt KJ, Ghosh JK. Ambient air pollution and preterm birth in the environment and pregnancy outcomes study at the University of California, Los Angeles. *Am J Epidemiol.* 2007; 166(9):1045-52.

Ritz B, Yu F, Chapa G, Fruin S. Effect of air pollution on preterm birth among children born in Southern California between 1989 and 1993. *Epidemiology.* 2000;11(5):502-11.

Ritz B, Yu F. The effect of ambient carbon monoxide on low birth weight among children born in southern California between 1989 and 1993. *Environ Health Perspect.* 1999 Jan;107(1):17-25.

Robertson SA, Mayrhofer G, Seamark RF. 1992. Uterine epithelial cells synthesize granulocyte-macrophage colony stimulating factor and interleukin-6 in pregnant and nonpregnant mice. *Biol Reprod* 46(6):1069-79

Robertson SA, Chin PY, Glynn DJ, Thompson JG. 2011. Peri-conceptual cytokines--setting the trajectory for embryo implantation, pregnancy and beyond. *Am J Reprod Immunol* 66 (1):2-10.

Rocha E Silva IR, Lichtenfels AJ, Amador Pereira LA, Saldiva PH. Effects of ambient levels of air pollution generated by traffic on birth and placental weights in mice. *Fertil Steril*. 2008; 90(5):1921-4.

Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, Robbins WA, Perreault SD. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod*. 2005 Oct;20(10):2776-83.

Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol*. 2001 Aug;23(4):291-9.

Sagiv SK, Mendola P, Loomis D, Herring AH, Neas LM, Savitz DA, Poole C. A time-series analysis of air pollution and preterm birth in Pennsylvania, 1997-2001. *Environ Health Perspect*. 2005;May;113(5):602-6.

Sahakian V, Anners J, Haskill S, Halme J. selective localization of interleukin-1 receptor antagonist in eutopic endometrium and endometriotic implants. *Fertil Steril*. 1993; 60: 276-9.

Salamonsen LA, Jones RL. Endometrial remodelling. In: Henry HL, Norman AW, eds. *Encyclopedia of Hormones*. San Diego, CA: Academic Press, 2003: 504–12.

Schauer JJ, Lough GC, Shafer MM, Christensen WF, Arndt MF, DeMinter JT, Park JS. Characterization of metals emitted from motor vehicles. *Res Rep Health Eff Inst*. 2006 Mar;(133):1-76.

Scheers H, Mwalili SM, Faes C, Fierens F, Nemery B, Nawrot TS. Does air pollution trigger infant mortality in Western Europe? A case-crossover study. *Environ Health Perspect*. 2011;Jul;119(7):1017-22.

Schofield G, Kimber SJ. 2005. Leukocyte subpopulations in the uteri of leukemia inhibitory factor knockout mice during early pregnancy. *Biol Reprod* 72(4):872-8.

Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, Zudová Z, Rubes J, Evenson DP, Perreault SD. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect*. 2000;108(9):887-94.

Semer D, Reisler K, MacDonald PC, Casey ML. Responsiveness of human endometrial stromal cells to cytokines. *Ann N Y Acad Sci*. 1991;622:99-110.

Sharara FI, Seifer DB, Flaws JA. Environmental toxicants and female reproduction. *Fertil Steril*. 1998;70(4):613-22.

Sharkey AM, Smith SK. The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2003;17(2):289-307.

Shen YL, Jiang YG, Greenlee AR, Zhou LL, Liu LH. MicroRNA expression profiles and miR-10a target in anti-benzo[a] pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide-transformed human 16HBE cells. *Biomed Environ Sci*. 2009 Feb;22(1):14-21.

Simón C, Frances A, Piquette GN, el Danasouri I, Zurawski G, Dang W, Polan ML. Embryonic implantation in mice is blocked by interleukin-1 receptor antagonist. *Endocrinology*. 1994 Feb;134(2):521-8.

Simón C, Martín JC, Pellicer A. Paracrine regulators of implantation. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 2000;Oct;14(5):815-26

Simón C, Mercader A, Gimeno MJ, Pellicer A. The interleukin-1 system and human implantation. *Am J Reprod Immunol*. 1997 Jan;37(1):64-72.

Simón C, Moreno C, Remohí J, Pellicer A. Cytokines and embryo implantation. *J Reprod Immunol*. 1998;Aug;39(1-2):117-31.

Simón C, Piquette GN, Frances A, Polan ML. Localization of interleukin-1 type I receptor and interleukin-1 beta in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab*. 1993 Aug;77(2):549-55.

Singh MM, Chauhan SC, Trivedi RN, Maitra SC, Kamboj VP. Correlation of pinopod development on uterine luminal epithelial surface with hormonal events and endometrial sensitivity in rat. *Eur J Endocrinol*. 1996;135:107–117.

Slama R, Darrow L, Parker J, Woodruff TJ, Strickland M, Nieuwenhuijsen M, Glinianaia S, Hoggatt KJ, Kannan S, Hurley F, Kalinka J, Srám R, Brauer M, Wilhelm M, Heinrich J, Ritz B. Meeting report: atmospheric pollution and human reproduction. *Environ Health Perspect*. 2008 Jun;116(6):791-8.

Somers CM. 2011. Ambient air pollution exposure and damage to male gametes: human studies and in situ 'sentinel' animal experiments. *Syst Biol Reprod Med* 57(1-2):63-71.

Squadrito GL, Cueto R, Dellinger B, Pryor WA. Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. *Free Radic Biol Med*. 2001;31(9):1132-8.

Srák RJ, Binková B, Dejmek J, Bobak M. Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature. *Environ Health Perspect*. 2005;113(4):375-82.

Stanek LW, Brown JS, Stanek J, Gift J, Costa DL. Air pollution toxicology – a brief review of the role of the science in shaping the current understanding of air pollution health risks. *Toxicol Sci*. 2011;Mar;120(1):58-27.

Stewart CL, Kaspar P, Brunet LJ, Bhatt H, Gadi I, Köntgen F, Abbondanzo SJ. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature*. 1992;359(6390):76-9.

Surveyor GA, Gendler SJ, Pemberton L, Das SK, Chakraborty I, Julian J, Pimental RA, Wegner CC, Dey SK, Carson DD. Expression and steroid hormonal control of Muc-1 in the mouse uterus. *Endocrinology*. 1995 Aug;136(8):3639-47.

Swiersz L, Giudice LC. Unexplained infertility and the role of uterine receptivity. *Infertil Clin N Am*. 1997; 8: 523–43.

Tabibzadeh S, Kong QF, Babaknia A, May LT. Progressive rise in the expression of interleukin-6 in human endometrium during menstrual cycle is initiated during the implantation window. *Hum Reprod*. 1995;Oct;10(10):2793-9.

Takeda K, Tsukue N, Yoshida S. Endocrine-disrupting activity of chemicals in diesel exhaust and diesel exhaust particles. *Environ Sci*. 2004;11(1):33-45.

Telisman S, Colak B, Pizent A, Jurasović J, Cvitković P. Reproductive toxicity of low-level lead exposure in men. *Environ Res*. 2007;105(2):256-66.

Thie M, Harrach-Ruprecht B, Sauer H, Fuchs P, Albers A, Denker HW. Cell adhesion to the apical pole of epithelium: a function of cell polarity. *Eur J Cell Biol.* 1995;66(2):180-91.

Tovey MG, Content J, Gresser I, Gugenheim J, Blanchard B, Guymarho J, Poupart P, Gigou M, Shaw A, Fiers W. Genes for IFN-beta-2 (IL-6), tumor necrosis factor, and IL-1 are expressed at high levels in the organs of normal individuals. *J Immunol.* 1988;Nov;141(9):3106-10.

Tsai DH, Amyai N, Marques-Vidal P, Wang JL, Riediker M, Mooser V, et al. 2012. Effects of particulate matter on inflammatory markers in the general adult population. *Part Fibre Toxicol* 6;9:24.

Tsukue N, Toda N, Tsubone H, Sagai M, Jin WZ, Watanabe G, Taya K, Birumachi J, Suzuki AK. Diesel exhaust (DE) affects the regulation of testicular function in male Fischer 344 rats. *J Toxicol Environ Health A.* 2001; 63(2):115-26.

U.S.EPA. Environmental Protection Agency. 40 CFR Part 50 National Ambient Air Quality Standards for Particulate Matter; Final Rule. Rules and Regulation. Federal Register. 2006 oct, 71(200): 61144 – 61233p. Disponível em: <http://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2006-10-17/html/06-8477.htm> Acesso em: 24/02/2012.

U.S.EPA. Environmental Protection Agency. 40 CFR Part 51 Clean Air Fine Particle Implementation Rule; Final Rule. Rules and Regulation. Federal Register. 2007 oct, 72(79): 20586 – 20667p. Disponível em: http://www.epa.gov/pmdesignations/1997standards/documents/Mar07/PM_rule_042507.pdf.

Ueng TH, Hung CC, Wang HW, Chan PK. Effects of amitraz on cytochrome P450-dependent monooxygenases and estrogenic activity in MCF-7 human breast cancer cells and immature female rats. *Food Chem Toxicol.* 2004;Nov;42(11):1785-94.

Vallero DA. Fundamentals of air pollution. 4th.ed. Amsterdam: Elsevier Academic Press; 2008.942p.

van den Hooven EH, Pierik FH, de Kluizenaar Y, Willemsen SP, Hofman A, van Ratingen SW, Zandveld PY, Mackenbach JP, Steegers EA, Miedema HM, Jaddoe VW. Air pollution exposure during pregnancy, ultrasound measures of fetal growth, and adverse birth outcomes: a prospective cohort study. *Environ Health Perspect.* 2012;Jan;120(1):150-6.

Vandermolen DT, Gu Y. Human endometrial interleukin-6 (IL-6): in vivo messenger ribonucleic acid expression, in vitro protein production, and stimulation thereof by IL-1 beta. *Fertil Steril.* 1996;Nov;66(5):741-7.

Vassilev ZP, Robson MG, Klotz JB. Associations of polycyclic organic matter in outdoor air with decreased birth weight: a pilot cross-sectional analysis. *J Toxicol Environ Health A.* 2001;64(8):595-605.

Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Maciel Ribeiro AA, Mayhew TM, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Biol Reprod.* 2008;Sep;79(3):578-84.

Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Guimarães Silva RM, Scoriza JN, Saldiva PH, Caldini EG, Dolhnikoff M. Chronic exposure to fine particulate matter emitted by traffic affects reproductive and fetal outcomes in mice. *Environ Res.* 2009;Jul;109(5):536-43.

Vogiagis D, Marsh MM, Fry RC, Salamonsen LA. Leukaemia inhibitory factor in human endometrium throughout the menstrual cycle. *J Endocrinol.* 1996;Jan;148(1):95-102.

Vogiagis D, Salamonsen LA. Review: The role of leukaemia inhibitory factor in the establishment of pregnancy. *J Endocrinol.* 1999;160(2):181-90.

von Wolff M, Thaler CJ, Strowitzki T, Broome J, Stolz W, Tabibzadeh S. Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle: dysregulation in habitual abortion. *Mol Hum Reprod.* 2000 Jul;6(7):627-34.

Walmer DK, Wrona MA, Hughes CL, Nelson KG. Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology.* 1992;Sep;131(3):1458-66.

Wang X., Ding H., Ryan L., Xu X. Association between air pollution and low birth weight: a community based study. *Environ Health Perspect.* 1997;105:514-520.

Warren RH, Enders AC. An electron microscope study of the rat endometrium during delayed implantation. *Anat Rec.* 1964;148:177–195.

Watanabe T, Shimada T, Endo A, 1979. Mutagenic effects of cadmium on mammalian oocyte chromosomes. *Mutat Res* 67, 349–356.

Wegmann TG. The role of lymphoid hematopoietic cytokines in signaling between the immune and reproductive systems. In: Strauss III JF, Lyttle CR (ed) *Uterine and Embryonic Factors in Early Pregnancy*. Plenum Press, New York, 1991, pp87-96.

Wenger D, Gerecke AC, Heeb NV, Schmid P, Hueglin C, Naegeli H, Zenobi R. In vitro estrogenicity of ambient particulate matter: contribution of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Appl Toxicol.* 2009 Apr;29(3):223-32.

Wesseling J, van der Valk SW, Hilkens J. A mechanism for inhibition of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane-associated mucin episialin/MUC1. *Mol Biol Cell.* 1996 Apr;7(4):565-77.

WHO. World Health Organization. Air quality guideline for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Global update – 2005. WHO, 20p. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_SDE_PHE_OEH_06.02_eng.pdf Acesso em: 18/04/2010.

WHO. World Health Organization. European Centre for Environment and Health. Effects of air pollution on children's health and development – a review of the evidence. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, 2005. Disponível em: http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0010/74728/E86575.pdf Acesso em: 18/04/2010.

WHO. World Health Organization. Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide. Report on a WHO Working Group, Bonn, Germany, 13-15 January 2003. Disponível em: <http://www.euro.who.int/document/e79079.pdf> Acesso em: 18/04/2010.

WHO. World Health Organization. Preterm birth. Fact sheet.363 May 2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs363/en/index.html> Acesso em: 15/05/2012.

Wilhelm M, Ghosh JK, Su J, Cockburn M, Jerrett M, Ritz B. Traffic-related air toxics and preterm birth: a population-based case-control study in Los Angeles County, California. *Environ Health.* 2011;Oct;7;10:89.

Wilhelm M, Ghosh JK, Su J, Cockburn M, Jerrett M, Ritz B. Traffic-related air toxics and term low birth weight in Los Angeles County, California. *Environ Health Perspect.* 2012 Jan;120(1):132-8.

Wilkins ET. Air pollution aspects of the London fog of December 1952. *Q J Roy Meteor Soc.* 1954;80(344):267-271.

Wren JD, Wu Y, Guo SW. A system-wide analysis of differentially expressed genes in ectopic and eutopic endometrium. *Hum Reprod.* 2007;22:2093–2102.

Xiong T, Zhao Y, Hu D, Meng J, Wang R, Yang X, Ai J, Qian K, Zhang H. Administration of calcitonin promotes blastocyst implantation in mice by up-regulating integrin $\beta 3$ expression in endometrial epithelial cells. *Hum Reprod.* 2012 Dec;27(12):3540-51.

Xu C, Zhang JJ, Chen JA, Cao B, Shu WQ, Cao J. Evaluation of ovotoxicity in female mice caused by organic extracts in tap water from Jialing River in Chongqing, China. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2010 Feb;89(1):26-33.

Xu X, Ding H, Wang X. Acute effects of total suspended particles and sulfur dioxides on preterm delivery: a community-based cohort study. *Arch Environ Health.* 1995 Nov-Dec;50(6):407-15.

Xu X, Sharma RK, Talbott EO, Zborowski JV, Rager J, Arena VC, Volz CD. PM10 air pollution exposure during pregnancy and term low birth weight in Allegheny County, PA, 1994-2000. *Int Arch Occup Environ Health.* 2011;Mar;84(3):251-7.

Yamamoto M, Singh A, Sava F, Pui M, Tebbutt SJ, Carlsten C. MicroRNA Expression in Response to Controlled Exposure to Diesel Exhaust: Attenuation by the Antioxidant n-Acetylcysteine in a Randomized Crossover Study. *Environ Health Perspect.* 2013 Apr 12.

Yang IA, Fong KM, Zimmerman PV, Holgate ST, Holloway JW. Genetic susceptibility to the respiratory effects of air pollution. *Thorax.* 2008;Jun;63(6):555-63.

Yang ZM, Le SP, Chen DB, Cota J, Siero V, Yasukawa K, Harper MJ. Leukemia inhibitory factor, LIF receptor, and gp130 in the mouse uterus during early pregnancy. *Mol Reprod Dev.* 1995 Dec;42(4):407-14.

Zhou W, Ye SH. Mutagenicity of scooter exhaust particulate matter. *J Toxicol Environ Health.* 1997;52(1):35-44.