JÚLIA NOGUEIRA SCORIZA CORTES

**O IMPACTO DA EXPOSIÇÃO PRÉ-GESTACIONAL À
POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA SOBRE O PROCESSO DE
IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA EM CAMUNDONGOS**

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

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Elia Garcia Caldini

**SÃO PAULO
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Scoriza-Cortes, Júlia Nogueira

O impacto da exposição pré-gestacional à poluição atmosférica sobre o processo de
implantação embrionária / Júlia Nogueira Scoriza Cortes. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia experimental.

Orientadora: Elia Garcia Caldini.

Descritores: 1. Desenvolvimento embrionário 2. Poluição do ar 3. Mastócito
4.NK uterina

USP/FM/DBD-195/12

Dedico este trabalho a Daniel Cortes, meu marido. Nós namorávamos quando iniciei o Curso de Pós-graduação; ficamos noivos, nos casamos e agora queremos um bebê. Durante toda esta etapa você me deu a segurança e o amor que eu tanto precisava. Obrigada.

AGRADECIMENTOS

Obrigada, Senhor Deus, por ter chegado até aqui. O Senhor me guiou, me amou, me consolou, me inspirou, me deu alegrias, me fez sonhar e me ensinou a realizar. Tudo é graças ao Senhor, e é assim que quero que continue sendo.

À Pesquisadora Dra. Mariana Matera Veras, do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por toda dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho. Com amor e carinho, você me ensinou além da estereologia e além da placenta, me mostrando como ser uma profissional que ama o que faz.

À Profa. Dra. Elia Garcia Caldini, do Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ter aberto as portas do laboratório para que este projeto pudesse ser desenvolvido, pelo seu apoio em todas as etapas do trabalho.

Ao Prof. Dr. Áureo Yamada, e seus alunos Juarez Bianco e Claudia Kanashiro do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, por sua dedicação ao me acolher em seu Laboratório para estudar as células NK uterinas.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que nos contagiou pelo entusiasmo de sua ideia inicial, por seu exemplo e apoio incondicional.

À Profa. Dra. Rossana Pulcineli, Professora Associada da Disciplina de Obstetrícia, pela leitura crítica do manuscrito e sugestões que enriqueceram o trabalho.

À Mestre Angela Batista Gomes dos Santos, que realizou as reações dos preparados de imunoistoquímica.

Aos meus amigos e colegas de Pós-graduação Karla Ribeiro de Castro, Maria Angélica Peres, Adair Aparecida Santos Alemany e Gabriel Ribeiro Junior, pelo companheirismo.

Aos colegas e funcionários do Laboratório de Biologia Celular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Nilsa Damasceno Rodrigues, Maria Ires Amorin, Gildásio, Valéria, Felipe e Marcelo.

À Tânia Regina de Souza, Secretária do Programa Fisiopatologia Experimental, pelo seu apoio administrativo.

Aos meus pais, Eliana e Rafael, e irmãos Rafael e Nathália, por serem muito amorosos e por sempre me apoiarem.

Aos meus familiares e amigos Elaine Nogueira, Vó Olga, Elias, Elaine Palma, Eliandro e Rosana, Milene, Rafael, Daniel, Késia, Adriana, Tiago, Pastora Aline e Pastor Jayson por todo o companheirismo e amizade.

E pela nova família Belarmino, Aparecida, Kátia, Gabriela, Davi e Heloisa Cortes, que sempre me receberam com muito amor e carinho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Evidências Experimentais	4
2.2. A Implantação embrionária e reação decidual	5
2.3. Papel das células NK uterinas na gestação	9
2.4. Papel do mastócito na gestação	12
2.5. Papel do macrófago na gestação	14
2.6. Métodos estereológicos para quantificação tecidual	15
3. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	21
4. MATERIAS E MÉTODOS	22
4.1. Animais	22
4.2. Local de exposição	22
4.3. Condições da exposição e análise do ar	23
4.4. Exposição nas câmaras de inalação e grupos experimentais.....	25
4.5. Parâmetros Reprodutivos	26
4.6. Processamento histológico do material	27
4.7. Metodos de identificação histológica	29
4.8. Análise estereologica do volume do sítio implantacional	33
4.9. Análise da densidade numérica e do número absoluto de células NK uterinas no sítio implantacional	35
4.10. Análise da densidade numérica e do número absoluto de células de macrófagos no sítio implantacional	35
4.11. Análise da densidade numérica de mastócitos por área no sítio implantacional	36
4.12. Análise estatística	37

5. RESULTADOS	38
5.1. Poluição do ar	38
5.2. Parâmetros de acasalamento e fertilidade	38
5.3. Índice de perda pré-implantacional	40
5.4. Perda pós-implantacional	41
5.5. Análise estereológica do volume do sítio implantacional	42
5.6. Análise da densidade numérica e do número absoluto de células NK uterinas no sítio implantacional	45
5.7. Análise da densidade numérica e do número absoluto de macrófago no sítio implantacional	46
5.8. Análise da densidade numérica de mastócitos por área no sítio implantacional	47
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	56
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

Al- alumínio
bFGF- Fator de crescimento de fibroblasto básico
C- Carbono
Ca- Cálcio
Cd- Cádmio
CETESB- Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CL- Corpo Lúteo
CO- Monóxido de Carbono
CO₂- Dióxido de Carbono
COBEA- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CRH- Hormônio Liberador de Corticotrofina
Cu- Cobre
dp- Desvio padrão
dpc- dias pós coito
EGF- Fator de Crescimento Epidérmico
F- Câmara de ar filtrado
Fe- Ferro
FMUSP- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
g- grama
HC- hidrocarbonetos
HE- hematoxilina-eosina
HPA- Hidrocarboneto Policíclico Aromático
IL- Interleucina
K- Potássio
LAPAE- Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental
m- metro
mm- milímetro
µm - micrômetro
MP- Material Particulado
MP₁₀- Material Particulado de diâmetro aerodinâmico de até 10µm

NF- Câmara de ar não filtrado

NK- Células Natural Killer

NKu- Células Natural Killer Uterinas

NO₂- Dióxido de Nitrogênio

Pb- Chumbo

PR- Progesterona

ROS- Espécies Reativas de Oxigênio

S- Enxofre

Si- Silício

SINASC- Sistema Nacional de Nascidos Vivos

SO₂- Dióxido de Enxofre

SP- Estado de São Paulo

TGF- β - Fator beta transformador de crescimento

Ti- Titânio

TNF- Fator de Necrose Tumoral

UV- ultravioleta

VEGF- Fator de Crescimento Endotelial Vascular

WHO- World Health Organization

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de acasalamento e fertilidade em camundongos expostos na câmara filtrada e não filtrada.

Tabelas 2 e 3 - Tabelas ilustrativas das comparações e dos resultados obtidos pelo Teste de Fisher para acasalamento e fertilidade em camundongos expostos na câmara filtrada e não filtrada

Tabela 4 - Parâmetros implantacionais

Tabela 5 - Dados obtidos para reabsorção pósimplantacional em camundongos fêmeas expostos na câmara filtrada e não filtrada.

Tabela 6 - Parâmetros de desenvolvimento do sítio implantacional 6dpc

Tabela 7 - Parâmetros de desenvolvimento do sítio implantacional 8dpc

Tabela 8 - Avaliação das NKu entre os grupos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Decidualização e placentação em camundongos.

Figura 2 - Representação esquemática do método *disector*.

Figura 3 - Fotografia aérea do local de exposição

Figura 4 - Os esquemas ilustram as câmaras não-filtrada (na parte superior) e a câmara filtrada (embaixo) com os filtros em sequência

Figura 5 - Representação da tuba uterina com os sítios de implantação e da face de corte dos blocos de parafina.

Figura 6 - Representação do modo que os cortes foram coletados para as análises

Figura 7 - Fotomicrografia do sítio de implantação no 8º dia pós coito

Figura 8 - Fotomicrografia obtida com a objetiva de 4x representativa da aparência histológica dos sítios implantacionais corados com HE aos 8 dpc

Figura 9 - Fotomicrografias representativas da aparência histológica dos sítios implantacionais tratados Lectina DBA aos 8 dpc

Figura 10 - Fotomicrografia obtida com a objetiva de 20x representativa da aparência histológica dos sítios implantacionais corados com azul de toluidina aos 8 dpc

RESUMO

Scoriza-Cortes JN. *O impacto da exposição pré-gestacional à poluição atmosférica sobre o processo de implantação embrionária em camundongos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012.

Nós humanos estamos inevitavelmente expostos a uma mistura de poluentes, e evidências nos mostram que estes poluentes aumentam a incidência de desordens reprodutivas. Já se sabe que camundongos cronicamente expostos a níveis de poluentes ambientais em São Paulo apresentam: mudanças no ciclo estral, alteração no número de folículos ovarianos, aumento das perdas embrionárias pós implantacionais e alterações na morfologia placentária. Nós hipotetizamos que as alterações na resposta uterina a implantação possa ser mediado por mastócitos e células NK uterinas levando ao aumento na incidência de perdas pós implntacionais associadas a poluição do ar. Para testar essa hipótese, camundongos foram expostos a níveis ambientais de poluentes até os 60 dias de vidas usando câmaras de exposição [uma câmara recebendo ar filtrado e a outra ar ambiente (poluído) não]. Ao atingir a idade reprodutiva os animais foram colocados para acasalar, os machos utilizados neste estudo não foram expostos aos poluentes, e no 6º e 8º dia pós-coito a gestação foi terminada. O desempenho reprodutivo foi avaliado e as fêmeas foram subdivididas em 4 grupos de acordo com a idade gestacional (6º ou 8º dpc) e exposição (ar filtrado ou ar não filtrado). Métodos estereológicos foram usados para avaliar o desenvolvimento dos sítios de implantação, contagem das células NK uterinas e mastócitos. A concentração de média de PM2.5 nas câmaras com o ar não filtrado foi de 27.5 $\mu\text{g.m}^{-3}$ e 6.5 $\mu\text{g.m}^{-3}$ na câmara com ar filtrado ($P<0.001$). A exposição a poluição do ar nos primeiros dias de gestação mostrou há diferenças no desenvolvimento dos compartimentos do sítio de implantação no 8º dia pós-coito: redução do volume endométrio e volume total do sítio. Quando nós

avaliamos o número total de NK uterina o 8º dia pós-coito, observamos que há uma redução no número destas células nos animais expostos a poluição do ar. Os mastócitos no 6º dia gestacional também se mostram em menor número nos animais expostos a poluição, mas essa diferença desaparece com o avanço da gestação. Na avaliação histopatológica do endométrio, verificamos que há uma redução do volume de células decíduais, de trofoblasto, e um aumento do volume de glândulas nos sítios implantacionais no 8º dia pós-coito de animais expostos ao ar poluído. Nossos resultados confirmam os achados de estudos prévios que correlacionam a exposição a poluição do ar com aumento na incidência de falhas implantacionais e fertilidade diminuída. A avaliação da morfologia uterina e do número de células NK uterinas e mastócitos sugerem que os compostos presentes no ar interferem ou prejudicam o processo de implantação embrionária por alterações na resposta do sistema imunológico materno.

Descritores: 1. Desenvolvimento Embrionário; 2. Poluição do Ar; 3. Mastócito; 4. NK uterina

ABSTRACT

Scoriza-Cortes JN. *The impact of pre-gestational exposure to air pollution on embryonic implantation process in mice* [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2012.

Humans are inevitably exposed to mixtures of environmental contaminants, and a vast body of evidence now links exposure to these chemicals with an increased incidence of reproductive disorders. We have shown that mice chronically exposed to ambient levels of air pollution (AP) in São Paulo city have negative reproductive performance: resulting in changes in estrous cyclicity, number of follicles and increased post implantation loss rate as well defective placentation. We hypothesized that alterations in uterine response to implantation could be mediated by mast and uNKcells leading to increased incidence of pos implantation losses associated with exposure to air pollution. To test this female mice were exposed to ambient levels of AP from birth to 60 days of age using exposure chambers (receiving filtered air or non filtered situated near to a high traffic crossroad). On reaching the reproductive age, estrous cyclicity, was evaluated and females were allowed to mate to non exposed males and exposures continued until 6^odpc or 8^odpc when pregnancy was terminated. Reproductive performance was assessed and females, subdivided in to 4 groups according to gestational day (6^odpc or 8^odpc) and exposure (filtered or non filtered air). Stereological methods and immunohistochemical techniques were used to evaluate implantation sites (IS) development, do cell identification (NK cells and Mast cells) and counts. Mean concentration of PM_{2.5} in the non-filtered chamber was 27.5 µg.m⁻³ and 6.5 µg.m⁻³; in the filtered chambers (P<0.001). Females exposed to air pollution previously and during the first days of pregnancy showed borderline differences in the development of the compartments of the IS on day 8 of gestation: volume of the endometrium is reduced as well as the IS total volume. When we evaluated the total number of uNk cells (8^odpc), we observed that there is a decrease in those animals exposed to air pollution.

The number of mast cells (6^o dpc) are also reduced when compared to females exposed to filtered air, but as pregnancy progress this differences in the number of mast cells disappear.

The histopathological evaluation was observe the decrease in the volume occupied by decidual and trophoblast cells, and increased the volume of glands, showing development delay in implantation sites in 8dpc. Our data confirm results from previous studies that link exposure to AP and decreased fertility and increased implantation failure. Evaluation of the uterine morphology and the number of mast cell and uNkcell suggests that components present in AP interfere or impair embryonic implantation trough changes in maternal immune system responses.

Description: 1. Embryonic development; 2. Air pollution; 3. Mast cell; 4. Uterine NK.

1. INTRODUÇÃO

Cada vez mais as pesquisas na área de reprodução têm enfatizado a importância do período pré e periconcepcional para o desenvolvimento normal da gestação e do conceito. Já se sabe que interferências que ocorrem nos estágios iniciais de desenvolvimento podem ter influência contínua e ao longo da vida sobre a saúde e desenvolvimento de doenças crônicas no adulto e na criança (Gillman, 2002). A partir desta perspectiva, os estudos que buscam desvendar e identificar as causas de alterações na saúde da criança devem incluir uma avaliação dos estágios iniciais do desenvolvimento, bem como da saúde materna e paterna anteriormente e à época da concepção (Chapin e Buck, 2004). Inúmeros são os exemplos que comprovam a importância desta associação; são estudos toxicológicos, epidemiológicos e experimentais que revelam que a exposição parental a agentes como drogas ilícitas, medicamentos (Oiel et al., 2012; Gonzales e Fernandez-Salguero, 1998), fumo e contaminantes ambientais) podem levar a alterações gestacionais e fetais (Ortega-García et al., 2012; Prins et al., 2012., Buck Louis et al., 2006; McDiarmid, Gehle, 2006., Lawson et al., 2004; Mocarelli et al., 2000 .

A partir de 1990, vários estudos têm chamado a atenção para a associação entre a poluição do ar, especialmente por CO, NO₂, SO₂, e o material particulado (MP 2,5) e alterações no crescimento fetal e na duração da gestação (van den Hooven et al., 2012 Venditti et al., 2011; Lacasana et

al., 2005; Srám et al., 2005; Maisonet et al., 2004; Glinianaia et al., 2004a; Glinianaia et al., 2004b).

Em sua maioria são estudos epidemiológicos que indicam uma associação da exposição parenteral à poluição do ar nos grandes centros urbanos com desfechos negativos como o baixo peso do recém nascido, mortalidade neonatal, prematuridade e restrição no crescimento intrauterino (Holstius et al., 2012; Chang et al., 2012; ; Liu et al., 2003; Maisonet et al., 2001; Gauderman et al., 2000; Wang et al., 1997). Porém, ainda não são bem conhecidos os mecanismos biológicos pelos quais a mistura de poluentes atmosféricos afetaria o desenvolvimento da gestação.

Uma hipótese sugere que a poluição do ar provocaria um estado inflamatório na placenta que comprometeria seu funcionamento. Além disso, há a possibilidade que a poluição do ar possa afetar o desenvolvimento placentário agindo sobre aos mecanismos que são sensíveis ou que respondem a tensão de oxigênio. Mais ainda, a exposição à poluição do ar ocorrendo no início da gestação, poderia acarretar o desenvolvimento insuficiente do trofoblasto e, por consequência, uma vascularização precária da placenta (Veras et al., 2008).

Considerando as dificuldades técnicas e as questões éticas, a investigação em humanos torna-se uma tarefa muito difícil; assim, em 2005 o grupo de pesquisadores do LPAE-FMUSP (Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) iniciou estudos experimentais em camundongos expostos às condições reais de poluição do ar na cidade de São Paulo para investigação

de possíveis efeitos deletérios sobre a função reprodutiva, entre outras, e os mecanismos biológicos associados.

Estes estudos mostraram que há um prejuízo na capacidade reprodutiva caracterizado pela redução no índice de fertilidade, no índice gestacional e comprometimento do desenvolvimento fetal como baixo peso ao nascer, perdas fetais, alterações na ciclicidade estral, diminuição da reserva folicular e aumento do número de perdas pós implantacionais (Mohallem et al., 2005, Veras et al., 2008, 2009 e 2010). Mais ainda, o grupo de LPAE –FMUSP mostrou que o prejuízo ao desenvolvimento fetal, evidenciado pelo baixo peso ao nascer, está associado a alterações na morfologia funcional da placenta (Veras et al., 2008).

Sendo assim, há necessidade de estudos direcionados a investigar os possíveis efeitos da exposição à poluição atmosférica especificamente sobre o processo implantacional, uma vez que é neste período que se estabelecem as bases morfofuncionais da interação materno-fetal. Para tal, este trabalho estudou, em modelo murino, os efeitos da exposição materna crônica ao material particulado atmosférico da cidade de São Paulo sobre o desenvolvimento do sítio implantacional no início da gestação, através de avaliação estereológica das dimensões do sítio e seus compartimentos e das populações celulares que sabidamente tem papel relevante para uma implantação embrionária bem sucedida, como são os linfócitos NK, os mastócitos e os macrófagos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. EVIDÊNCIAS EXPERIMENTAIS

A literatura científica é extremamente pobre no que se refere a estudos experimentais utilizando animais de laboratório expostos a condições ambientais reais de poluição do ar para obtenção de dados sobre a eficiência reprodutiva. De modo geral, os dados da literatura se limitam a estudos toxicológicos utilizando compostos específicos ou a exaustão de motores a diesel (Croy, Kiso, 1993; Croy et al., 2006; Taront et al., 2009).

O LPAE-FMUSP foi pioneiro na investigação experimental dos efeitos da poluição do ar sobre a saúde reprodutiva em condições ambientais reais utilizando um modelo de exposição de várias gerações de animais. Para tal, camundongos foram mantidos em duas câmaras de exposição localizadas próximas a uma rua movimentada de São Paulo, sendo que uma câmara recebia ar ambiental e a outra recebia o ar filtrado. Nestas condições, a exposição crônica mesmo em níveis moderados trouxe prejuízos ao processo reprodutivo com efeitos agravados para a segunda geração. As fêmeas de camundongos fêmeas da primeira geração, que cresceram submetidas à poluição ambiental, apresentaram menor número de filhotes nascidos vivos e maior índice de falha no processo de implantação (Mohallem et al., 2005). Porém, para a segunda geração de

animais, além dos efeitos já descritos, observou-se redução significativa do peso ao nascer (cerca de 20%) associada a alterações placentárias e um aumento na incidência de perdas pós implantacionais, além de alterações relacionadas aos índices de fertilidade e gestacional, à ciclicidade estral e à reserva folicular de fêmeas nulíparas (Veras et al., 2008; 2009 e 2010).

2.2. A IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA E REAÇÃO DECIDUAL

A implantação embrionária é o início do relacionamento direto entre o organismo materno e o embrião e com o avanço da gestação esta relação torna-se gradativamente mais complexa com o desenvolvimento da placenta. Nos camundongos, a implantação tem início logo após a chegada do blastocisto no útero, por volta do 4-5 dpc (dia pós-coito). Nesta fase, o embrião apresenta-se como uma esfera polarizada com uma cavidade central, a blastocèle. Em um dos polos, internamente, aglomeram-se células da massa celular interna (ou embrioblasto) que darão origem ao embrião. Exceto por este polo, a blastocèle está revestida por uma camada de células achatadas, denominada trofoblasto, que dará origem a placenta e parte dos anexos placentários. Nesta fase inicial, o trofoblasto pode ser dividido em duas porções: o trofoblasto polar, que reveste a massa celular interna, e o trofoblasto mural que reveste a blastocèle (Billington 1971; Muntener et al., 1977).

A implantação é regida pela ação de hormônios ovarianos, progesterona e estrógenos; que preparam o ambiente uterino. A progesterona induz um estado pré-receptivo, que é responsivo ao estrógeno. Por sua vez, o estrógeno, sob a forma de estradiol, atua tanto no útero, ativando a secreção uterina de fatores de crescimento (como o EGF, por exemplo), como no trofoblasto, tornando-o competente para a implantação, através da ação do catecolestrogeno (4-hydroxiestradiol-17b) (Paria et al., 1998). O trofoblasto passa, então, a produzir IL-1b que é necessária para que o útero permaneça em estado receptivo, a ausência de IL- 1 ou de seus receptores no tecido uterino impede a adesão do trofoblasto ao útero (Krüssel et al., 1998).

A janela implantacional, ou período receptivo do endométrio é caracterizado por mudanças morfológicas e funcionais no endométrio tais como a expressão de moléculas de adesão, citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e proteinases de invasão (Soares et al., 2008; Mas et al., 2008; Simón, Valbuena, 1999; Rogers, Harper 1992; Murphy, 1989;).

O trofoblasto de Roedores apresenta uma atividade fagocitária máxima durante o período de implantação; à medida que a placenta se desenvolve, a atividade fagocitária diminui gradativamente. Acredita-se que a fagocitose facilite o processo de invasão embrionária, contribua com a nutrição inicial do embrião antes da formação da placenta e participe da aquisição de espaço para o desenvolvimento embrionário (Chhabra et al., 2012; Senner e Hemberger, 2010; Moffet-King 2002; Katz, Abrahamsohn, 1987; Kanaiazuma et al., 1984; Tachi et al., 1970).

O processo de decidualização envolve a diferenciação dos fibroblastos do estroma uterino em células deciduais como uma resposta do útero à implantação do blastocisto (Glasser, 1991). Esta diferenciação é induzida pela progesterona e pelo estrógeno e é um pré requisito para o sucesso da implantação. Este processo (decidualização) é iniciado na região antimesometrial aos 4,5 dpc. Nos próximos 3 dias de gestação, as células deciduais envolvem o sítio de implantação e se proliferam e diferenciam extensivamente, tornando-se maiores, binucleadas ou poliplóides (Ansell et al., 1974).

Presume-se que a decídua exerça um papel fundamental, estando envolvida na troca de gases, nutrientes, catabólitos, na secreção de hormônios, fatores de crescimento e citocinas que ajudarão a manter a gestação (Salamonsen et al., 2003). Além disso, as células deciduais, por estarem densamente agregadas previnem que células sanguíneas e proteínas maternas alcancem o embrião (Parr, 1986). A decídua é um tecido transiente que se mantém até a instalação funcional da placenta (10,5 dpc) e regride paulatinamente até formar uma fina camada de células ao redor da placenta e embrião, conhecidas como decídua basal e decídua capsular respectivamente (para revisão ver Lim e Wang, 2010), que continuam funcionando como uma barreira seletiva que protege o embrião (Parr et al., 1986).(Figura 1).

Figura 1 – Decidualização e placentação em camundongos. A - No dia 4^o. dia, o blastocisto está em processo de implantação, aderido ao epitélio uterino. No lado antimesometrial do estroma inicia-se a resposta decidual. B- No 7^o. dia, o embrião é maior e o cone ectoplacentário vai em direção mesometrial, rica em vasos sanguíneos. Nesta fase, a diferenciação decidual atinge quase todo o sitio implantacional. C- No 13^o. dia, a placenta já está desenvolvida e a decídua aparece constituída apenas por uma faixa de células em volta da placenta (decídua basal) e do embrião (decídua capsular). AM: antimesometrial; M: mesometrial; SI: sítio implantacional; Figura adaptada de Lim e Wang, 2010.

Além das células deciduais, o estroma endometrial também contém uma população variável de células não deciduais como leucócitos, macrófagos e mastócitos que desempenham papéis importantes para o sucesso da gestação.

2.3. PAPEL DAS CÉLULAS NK UTERINAS NA GESTAÇÃO

Há evidências que células do sistema imune presentes na decídua são importantes componentes regulatórios do meio uterino durante o início da gestação em camundongos. Os leucócitos deciduais tem sido extensivamente caracterizados não somente com o objetivo de esclarecer aspectos da tolerância materno-fetal (Blois et al., 2007) mas também para elucidar suas funções regulatórias no início da gestação, que estão além de suas funções clássicas de defesa imunológicas.

Um tipo celular em especial, os linfócitos Natural Killer (NK) tem sido muito estudados dentro deste contexto. São células originadas na medula óssea a partir de células progenitoras CD 34+ que populam diferentes órgãos linfoides e não linfoides, como timo, linfonodos, baço e útero. São células especializadas com atividade citotóxica para células tumorais e células infectadas por vírus, além de secretarem uma variedade de citocinas. O subtipo celular Natural Killer Uterinas (NKu) é um exemplo do papel regulatório que estas células podem desempenhar, além da sua função citolítica clássica. Ainda que esteja presente em pequena quantidade no estroma uterino humano, células NK maduras aparecem, no camundongo, no início do processo de implantação quando irão desempenhar um papel ativo na regulação da angiogênese que dará origem aos vasos placentários (Colucci et al., 2003; Hanna e Mandelboim, 2007).

Estas células são caracterizadas por serem CD56^{bright} CD16⁻ CD57⁻. Em camundongos, a caracterização inequívoca de que estas células uterinas pertencem à linhagem linfocitária NK foi obtida através de uma série de experimentos (Croy e Kiso, 1993; Moulton et al., 1981). As NKu podem medir de 20 a 50µm de diâmetro, ocasionalmente são binucleadas e contêm grânulos citoplasmáticos (Parr et al., 1986; Paffaro et al., 2003). Nos grânulos foram identificadas diversas enzimas tais como, as perforinas, granzinas, proteoglicanas e uma gama de variedade de enzimas hidrolíticas lisossomais (Parr et al., 1986).

No camundongo as células NKu representam 70% do total de leucócitos decíduais. No rato e no camundongo estas células NKu podem ser encontradas na decídua mesometrial a partir do 5-6 dpc, atingem o número máximo por volta do 13-14 dpc e a partir do 15 dpc tem sua população diminuída (Croy et al., 2006; Stewart et al., 1978). O recrutamento destas células a partir do sangue periférico e sua proliferação são controlados por hormônios maternos (Nakashima et al., 2012).

Apesar de que ensaios *in vitro* tenham demonstrado que a atividade citotóxica das NKu seja consistentemente menor do que das NK do sangue periférico (Kopcow et al., 2005), sabe-se que aumento acima do esperado na população das células NK no início da gestação está envolvido em abortos espontâneos e desfechos gestacionais negativos (Gendron e Baines, 1988).

O sucesso da gestação depende também da coordenação e interação entre as NKu, o citotrofoblasto e as células decíduais do estroma,

para assim produzirem um ambiente hormonal e citológico favorável que promova o remodelamento vascular que garanta um suprimento adequado de nutrientes para o feto (Hanna et al., 2006).

As células NKu são conhecidas por produzirem grande número de citocinas e fatores de crescimento, incluindo: fator de necrose tumoral (TNF- α), IL-10, IL-1 β , fator estimulador do crescimento de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), fator de crescimento transformador (TGF β), fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), fator inibidor da leucemia (LIF), interferon (IFN- γ) (Blois et al., 2011).

Em relação à secreção de fatores de controle de proliferação vascular, as NKu são a maior fonte decidual de angiopoetina (Ang-1 e Ang-2), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF-C), fator de crescimento placentário (PIGF) e TGF- β 1 (Saito et al., 1993; Lash et al., 2006). Assim sendo, as células NK são essenciais para a regulação do remodelamento vascular que ocorre nas fases iniciais da gestação (Torry et al., 2007).

Estudos em camundongos evidenciam que as células NK uterinas regulam em parte a vasodilatação que ocorre durante a gestação por meio do aumento do fluxo sanguíneo no local da implantação. A diminuição do número de NKu tem sido frequentemente associada a defeitos do desenvolvimento decidual incluindo hipocelularidade, necrose e edema; além disso, demonstrou-se que a deficiência de NKu altera o desenvolvimento vascular na decídua de modo a diminuir o fluxo sanguíneo adequado para o manutenção da gestação (Ashkar et al., 2000 e 2003). Camundongos *knockout* NK ^{-/-} apresentam na região decidual artérias

espiraladas que retiveram a camada muscular na sua parede (conservando o menor calibre como se apresentavam no animal não gestante) (Croy, et al., 2000).

2.4. PAPEL DO MASTÓCITO NA GESTAÇÃO

De modo geral, os mastócitos são células relacionadas com a iniciação, a manutenção, a ampliação da resposta inflamatória (Metcalf, et al., 1997) e a resposta alérgica (Marshall e Jawdat, 2004). Quando ativados, os mastócitos liberam potentes mediadores, que são capazes de induzir a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (Logan et al., 2003; Crowe e Perdue, 1992).

Os mastócitos podem produzir, armazenar e liberar muitos tipos de mediadores químicos, incluindo histamina, triptases, quimases, heparina, proteoglicanos, fatores de crescimento, (FGF- β , VEGF, e TGF- β), e citocinas (TNF- α , IL-6, e IL-8). Os fatores de crescimento e as citocinas podem estar associados tanto à angiogênese normal e como àquela associada a tumores (Ribatti et al. 2001; Ribatti e Crivellato, 2012; Michailidou et al., 2012).

No útero, a presença de mastócitos tem sido descrita em muitas espécies, incluindo a humana. Sabe-se que o número de mastócitos varia no ciclo estral em ratos, camundongos, cobaias e vacas, sugerindo assim uma influência dos hormônios femininos no recrutamento de mastócitos para o

útero (Jensen et al., 2011). No ambiente uterino, os mastócitos distribuem-se no miométrio, endométrio e na cérvix, podendo ser encontrados em maior número próximo aos vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (Jeziorska et al., 1995; Mori et al., 1997; Cabanillas-Saez et al., 2002).

Os mastócitos têm sido considerados importantes na implantação embrionária uma vez que sua degranulação leva à liberação de fatores como a histamina, a triptase, MMPs, VEGF que são cruciais para a degradação da matriz extracelular e para a neo-vascularização. Ambos fenômenos são essenciais para a correta implantação e desenvolvimento do embrião (Bosquiazzo et al., 2007). Alguns estudos indicam que as substâncias do mastócito, incluindo a histamina, podem participar no desenvolvimento placentário na regulação do crescimento e invasão do trofoblasto (Szukiewicz et al., 1999).

Ainda que o mecanismo de ativação desses mastócitos endometriais ainda não esteja bem estabelecido, sabe-se que o estradiol e a progesterona regulam a degranulação e a migração dos mastócitos para o útero (Jensen et al., 2010).

Estudos conduzidos em animais mostram que a degranulação do mastócito está correlacionada à formação de novos vasos sanguíneos na cérvix uterina (ratos) durante a segunda metade da gestação (Varayoud et al 2004).

2.5. PAPEL DO MACRÓFAGO NA GESTAÇÃO

Os macrófagos, assim como os mastócitos, se originam da medula óssea, inicialmente como monoblasto o qual se diferenciara a pró-monócito. Ao se dividirem, os pró-monócitos dão origem aos monócitos, que se dirigem para a corrente sanguínea e aí permanecem por várias horas, na forma de monócitos circulantes (Lee, et al 1996).

Uma vez na circulação, o monócito migra para diferentes tecidos e cavidades do organismo, diferenciando-se em macrófago, de acordo com o tecido e sua função (Tacke e Randolph, 2006).

Durante o processo inflamatório, ocorre aumento do número de monócitos circulantes e da sua produção na medula óssea, assim com a redução do tempo de permanência dos mesmos na circulação, devido à migração destas células para o foco da lesão (Grabher et al., 2007).

Durante a implantação embrionária, as células epiteliais uterinas que circundam o blastocisto sofrem apoptose e podem formar um meio antiinflamatório pelo aumento de citocinas Th-2. Isto pode explicar a presença do macrófago no local da implantação.

Nas gestações normais, os macrófagos também são encontrados próximos à artéria espiralada durante a invasão e transformação do trofoblasto. Alguns estudos mostram que mudanças na distribuição dos macrófagos são observadas em condições patológicas,

como na pré eclampsia, diabetes gestacional e abortos de repetição (Tremellen, Russell et al., 2012; Yilmaz et al. 2012; Reister et al., 2001).

Reister e colaboradores (2001) propõem um diferente papel do macrófago durante a invasão e diferenciação do trofoblasto, que é dependente dos fatores que o ativaram. Em gestações normais, o macrófago funciona como um suporte das células para facilitar a invasão do trofoblasto e formar a placenta. Em condições patológicas, o macrófago funcionaria como uma barreira para a invasão e diferenciação do trofoblasto pela indução de apoptose do trofoblasto prejudicando, consequentemente, a modificação das artérias espiraladas.

Hormônios uterinos “instruem” estas células a secretarem citocinas que promovem e facilitam a implantação e o desenvolvimento do embrião, como por exemplo, a IL-1 produzida pelos macrófagos que promove angiogênese (Hunt et al., 1997).

2.6. MÉTODOS ESTEREOLÓGICOS PARA QUANTIFICAÇÃO TECIDUAL

A necessidade de produzir dados quantitativos confiáveis sobre os componentes dos tecidos estimulou o desenvolvimento e o uso de métodos estereológicos nas ciências biológicas. A estereologia pode ser definida como: “um conjunto de procedimentos geométricos e estatísticos que permitem obter informações sobre estruturas tridimensionais, a partir de

medidas realizadas em imagens planas, bidimensionais, como aquelas obtidas em cortes histológicos preparados para a microscopia de luz e eletrônica” (Weibel, 1979).

A estereologia estima densidades: densidades de volume (V_V); densidade de comprimento (L_V); densidade de superfície (S_V) e densidade numérica (N_V). Também podem ser estimadas densidades por área, como por exemplo, densidade de área (A_A) e densidade numérica por área (N_A ou Q_A) (Mandarim-de-Lacerda, 2003).

A base da estereologia se encontra no princípio formulado pelo geologista francês August Delesse, em 1847: “A densidade de volume dos componentes de uma rocha é igual à sua densidade das áreas destes componentes que aparecem em cortes representativos feitos ao acaso”. Pelo princípio de Delesse pode-se afirmar:

$$\frac{\text{Área do componente}}{\text{Área da rocha}} = \frac{\text{Volume do componente}}{\text{Volume da rocha}}$$

ou seja:

$$A_A = V_V$$

As medidas estereológicas só são válidas se as amostras forem representativas do tecido e tomadas randomicamente (Gundersen et al., 1988).

Podem-se obter informações sobre o número, o volume, o comprimento e a área de superfície das estruturas, empregando-se regras simples para a contagem. As medidas são feitas nos cortes, tendo-se como

base o perfil bi-dimensional dos componentes de interesse. É indispensável que seja determinado um compartimento de referência, pois as medidas são obtidas como densidades ou concentrações: número de mitocôndrias no citoplasma, densidade de volume dos núcleos no epitélio, comprimento dos vasos no glomérulo, área de superfície das circunvoluções no córtex cerebral.

Quando se analisam razões corre-se sempre o risco de que aconteçam alterações nos dois componentes (objeto e compartimento de referência) e isso pode levar a conclusões equivocadas. Se há um aumento proporcional nas duas estruturas, a razão medida não se altera, dando a falsa impressão de que não houve mudanças. Por isso, o ideal é calcular sempre os valores absolutos sobre o objeto, pois isso fornece resultados fidedignos e indubitáveis, além de permitir a comparação entre os dados de diferentes grupos de estudo. Para calcular o volume de um determinado objeto em um compartimento, basta multiplicar sua densidade de volume pelo volume absoluto do compartimento de referência,

$$V_v \times \text{Volume da rocha} = \text{Volume total do componente na rocha}$$

O volume total do órgão pode ser obtido pesando-se o tecido a fresco. Pesa-se um frasco contendo uma solução com a mesma densidade do tecido, mergulha-se o tecido por completo na solução e pesa-se novamente. A diferença entre as pesagens corresponde ao peso do tecido; o volume do órgão em questão (em mm³) pode ser considerado como o peso

(em gramas) $\times 1000$ (Scherle, 1970). Em algumas situações, este método pode não ser adequado, ou, é necessário saber o volume de um compartimento de referência que não é um órgão inteiro, mas sim parte de um órgão (volume da valva mitral no coração, por exemplo). Pode-se utilizar o método de Cavalieri que, no século XVII, demonstrou que o volume de qualquer objeto pode ser estimado se o objeto for seccionado em fatias paralelas de espessura conhecida, a seguir somam-se todas as áreas de todas as fatias do objeto e multiplica-se este resultado pela espessura dos cortes.

Que seja do nosso conhecimento, não foram aplicados os conceitos da estereologia para obtenção de dados morfométricos do sítio implantacional de camundongos, **assim sendo, no presente estudo pretende-se determinar o volume ocupado pelo estroma endometrial e pelo miométrio no sítio implantacional.**

A avaliação do número de estruturas, como células, em tecidos tem sido um tema de constante aperfeiçoamento, que vai desde a estimativa do número de células em determinada área (densidade de área) até a estimativa da densidade numérica em determinado volume (Mandarim-Lacerda, 2003). Para esta última usa-se classicamente o método do *disector* publicado originalmente por Sterio (1984). Resumidamente o *disector* é um sistema de amostragem tridimensional que avalia objetos proporcionalmente a seu número sem levar em conta seu tamanho ou forma.

A densidade numérica (N_v) dos objetos é obtida usando-se conjuntos de duas secções paralelas e consecutivas separadas por uma

distância conhecida (espessura). Há uma regra de contagem a ser seguida de modo a evitar a superestimação dos objetos: só são contados os perfis dos objetos que aparecem em uma secção e desaparecem na seguinte. Além disso, deve-se estabelecer uma secção proibida e uma linha proibida (Figura 2).

Figura 2: Representação esquemática do método *disector*. O número de objetos a ser estimado estará contido dentro de um volume-teste definido pela área “ A_T ” multiplicado pela espessura “ t ”. Na figura, quatro objetos se relacionam com as secções e o volume do disector. A cada volume corresponde uma secção de contagem e uma de referência (no caso, a secção superior é a de contagem e a inferior é a de referência). Todos os objetos que cruzem a secção de referência não são contados. Como mostram as imagens à direita, a secção de contagem contem os objetos 1, 3 e 5 enquanto que a secção de referência contem os objetos 3 e 4. Neste exemplo será contado apenas os objeto 1 e 5, já que o objeto 2 não cruza nenhum dos planos, o 3 aparece nas duas secções, o 4 está contido na secção de referência (adaptado de Mandarin-Lacerda, 2003).

Assim sendo, o número de objetos amostrados está relacionado com o volume entre os dois cortes paralelos e consecutivos e é possível estimar a densidade numérica destes objetos a partir da fórmula :

$$N_V = \sum Q / (A_T \times t) ,$$

....onde $\sum Q$ é a somatória de objetos contados, A_T é a área do campo de amostragem e “ t ” é a distância entre os cortes paralelos.

Uma vez obtida a densidade numérica, o número absoluto de objetos pode ser calculado pela multiplicação da densidade numérica (Nv) pelo volume absoluto do compartimento de referência.

Que seja do nosso conhecimento, não há estudos quantitativos sobre a distribuição das células inflamatórias no sítio implantacional do camundongo. Assim sendo, **no presente estudo pretende-se determinar parâmetros quantitativos das células NK uterinas, mastócitos e macrófagos no sítio implantacional.**

3. JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Tendo em vista:

a) as evidências experimentais mostram que a exposição ao material particulado (proveniente da frota veicular) está relacionada a um aumento da incidência de falhas de implantação embrionária, do número de reabsorções embrionárias e de baixo peso ao nascer;

b) as evidências de que células que participam do sistema imunológico, tais como linfócitos NK, mastócitos e macrófagos, desempenham papel importante no estabelecimento no remodelamento vascular necessário para o estabelecimento eficaz da placenta.

...o objetivo deste estudo é determinar, através de uma análise morfométrica sem viés, pela estereologia, se a exposição ao ar ambiental da cidade de São Paulo seria capaz de promover alteração volumétrica nos sítios implantacionais no início da gestação e alteração quantitativa na população de células NK, mastócitos e macrófagos que poderia ser responsável, ao menos em parte, pelos desfechos gestacionais negativos já observados.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1. ANIMAIS

Este experimento foi conduzido de acordo com as regras determinadas pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina da USP e todos os animais foram tratados levando-se em consideração o alívio do sofrimento e desconforto.

4.2. LOCAL DE EXPOSIÇÃO

O experimento foi conduzido no jardim da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que está situado em um cruzamento com alto tráfego veicular (Figura 3). A poluição deste local é primordialmente veicular, com quase 67% de $PM_{2.5}$ (material particulado $\leq 2.5 \mu m$ em diâmetro aerodinâmico) emitidos pela frota veicular. No local do cruzamento, na rua principal (Av. Dr. Arnaldo), há cerca de 85 mil carros, 10 mil veículos a diesel e 6.500 motocicletas circulando diariamente. No outra rua (Rua Teodoro Sampaio), os números correspondentes são

aproximadamente 26 mil carros, 5 mil veículos a diesel e 800 motos (Cetesb, 2006).

Figura 3 – Fotografia aérea do local de exposição. A seta aponta para o local onde foram instaladas as câmaras de exposição no jardim da Faculdade de Medicina da USP (FMUSP), nas proximidades do cruzamento entre a Av. Dr. Arnaldo e a Rua Teodoro Sampaio. HC: Hospital das Clínicas; INCOR: Instituto do Coração.

4.3. CONDIÇÕES DA EXPOSIÇÃO E ANÁLISE DO AR

A exposição foi realizada como descrita por Mohallem et al. (2005), com o objetivo de criar um local real de exposição ao material particulado (PM) do ar emitido pela frota veicular. A exposição foi realizada usando duas câmaras de topo aberto montados lado a lado no mesmo local. Ambas as câmaras receberam ar ambiente a uma vazão de $20 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$,

porém em uma delas o ar foi filtrado. Dentro das câmaras, os animais foram mantidos em condições ambientais de temperatura e umidade.

Cada câmara foi composta de um cilindro de alumínio, de 2,0 metros de diâmetro e 2,15 metros de altura, coberto por uma película de plástico protegido contra raios UV. O ar era forçado para dentro das câmaras, antes de sair por meio de uma grande abertura no topo do cilindro. A pressão dentro das câmaras não eram superiores a 30mm.

A câmara que recebia diretamente o ar ambiental Foi denominada Não-filtrada (NF) enquanto que a outra recebendo ar filtrado foi chamada de Filtrada (F). A filtragem ocorria em três estágios de filtros (Purafil, São Paulo, Brasil) dispostos em série. No primeiro estágio eram eliminadas as grandes partículas (filtros simples e bag), enquanto no segundo e terceiro estágios (modelo JFL-90 seguido de filtro High Efficiency Particulate Air) eram removidas as partículas mais finas do ar. A Figura 4 corresponde a imagens representativas das câmaras de exposição.

Figura 4 - Os esquemas ilustram as câmaras não-filtrada (na parte superior) e a câmara filtrada (embaixo) com os filtros em sequência. A fotografia da esquerda mostra a aparência externa de uma das câmaras e a fotografia da direita mostra a acomodação dos animais no interior da câmara.

A concentração média de PM 2,5 foi determinada por análise gravimétrica (Chow, 1995) usando Impactadores tipo Harvard (Air Diagnostics Inc. e Engenharia, Harrison, ME, EUA) equipados com filtros de polycarbonato, com uma vazão de 10 L.m^{-1} . Os resultados foram expressos em $\mu\text{g.m}^{-3}$. As concentrações de CO (8 horas, não dispersivo e método por infravermelho), NO₂ (24 horas e método médias quimiluminescência) e SO₂ (24 horas e método por fluorescência) foram obtidas a partir da estação de monitoramento do Estado de São Paulo Agência Ambiental (CETESB), que se localizava a apenas a 100m do local das câmaras de exposição. Gases poluentes não foram retidos pelo sistema de filtragem e as concentrações de NO₂ e CO foram semelhantes em ambas as câmaras.

4.4. EXPOSIÇÃO NAS CÂMARAS DE INALAÇÃO E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Resumidamente, o grupo parental foi composto por 10 fêmeas e 5 machos. Estes ficaram durante 60 dias expostos na câmara que contém ar filtrado (F). Após esse período os animais acasalaram e após o nascimento da prole, foram divididos em 2 grupos. Metade das fêmeas e suas proles continuaram na câmara F; e a outra metade foi exposta na câmara NF (que recebeu ar ambiente). Depois do desmame as mães foram eutanasiadas e as proles formaram a primeira geração de animais gerados e crescidos

expostos e não expostos ao ar ambiental. Após 60 dias de vida, as fêmeas da primeira geração de ambas as câmaras acasalaram com machos crescidos na câmara de ar filtrado (para evitar uma possível influência da exposição paterna nos desfechos a serem estudados). Deste cruzamento nasceram nas duas câmaras os animais de segunda geração. Após 60 dias, as fêmeas desta segunda geração acasalaram com os machos nascidos em crescidos na câmara de ar filtrado. Deste acasalamento originaram-se os sítios de implantação utilizados neste estudo, que foram obtidos aos 6 dpc e aos 8 dpc, após eutanásia dos animais por overdose de anestésico inalatório Isoflurano.

Os dias 6 e 8 pós-coito foram escolhidos para este estudo por ser possível observar macroscopicamente os sítios de implantação e pertencerem a um tempo gestacional anterior ao estabelecimento da placenta.

4.5. PARÂMETROS REPRODUTIVOS

A verificação da cópula nas fêmeas da segunda geração foi feita por visualização do *plug* vaginal, que quando presente determina. 1º dia gestacional.

Para verificar se a exposição influenciou a capacidade reprodutiva das fêmeas os seguintes parâmetros e índices foram

determinados de acordo com o US EPA Guideline - Reproductive Risk Assessment (EPA, 1996):

- **Índice de acasalamento** = (nº fêmeas com presença de plug vaginal / nº fêmeas que coabitaram com machos) x100

- **Índice de fertilidade** = (nº de fêmeas prenhes / nº de fêmeas com presença de plug vaginal) x 100

- **Índice de perda pré-implantacional** = [(nº corpo lúteo – nº implantação) / Nº corpo lúteo] x100

- **Porcentagem de reabsorção pós-implantacional** = (no. reabsorções / no. de sítios implantacionais) x 100.

4.6. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO DO MATERIAL

A cavidade abdominal foi aberta e as tubas uterinas e os ovários foram removidos. As tubas uterinas foram avaliados macroscopicamente para determinação do número de sítios implantacionais. Tanto as tubas como os ovários foram fixados em solução de paraformaldeído (4% em PBS) por 24 horas e transferidos para solução de álcool 70% até o momento da inclusão em parafina.

Nas tubas já fixadas, cada sítio foi isolado e processado rotineiramente para inclusão em parafina. Resumidamente, o material foi desidratado em álcool (96% e 100), diafanizado em xilol (I e II); a seguir, o

material foi imerso em parafina líquida e levado à estufa (60°), por duas horas para embebição. Após esse período, o material foi incluído em parafina de maneira que cortes transversais da tuba uterina (Figura 5) fossem obtidos.

A figura 5 ilustra a obtenção e a representação dos sítios implantacionais nos blocos de parafina.

Figura 5: Representação da tuba uterina com os sítios de implantação e da face de corte dos blocos de parafina.

Com o auxílio do micrótomo, foram obtidos cortes histológicos de 5 µm de espessura de modo a esgotar todo o sítio implantacional. Os sítios que se apresentaram em processo de reabsorção foram computados porém não avaliados para volume ou número de células.

Os cortes histológicos dos sítios normais foram coletados sequencialmente, no intervalo de 50 µm até o término do bloco, de modo tal que os cortes de 1, 11, 21, 31 e assim por diante foram corados para HE; os cortes 2, 12, 22, 32, etc. foram corados com Azul de Toluidina (AT); os cortes 3 e 4, 13 e 14, 23 e 24 e assim por diante foram coletados aos pares

na mesma lâmina para o estudo do número de macrófagos pelo método do dissector; o mesmo aconteceu com os cortes 5 e 6, 15 e 16, 25 e 26, etc, que foram coletados aos pares para a contagem do número de células NKu.

A Figura 6 ilustra o esquema para coleta de cortes.

Figura 6: Representação do modo que os cortes foram coletados para as análises,. Notar que os cortes de número 7, 8, 9 e 10 foram desprezados, assim como os cortes 17, 18, 19 e 20 e assim por diante.

Os ovários foram incluídos em parafina e cortes histológicos de 5 µm de espessura foram obtidos de modo seqüencial e sistemático. Um a cada 10 cortes foi coletado em lâmina de vidro até o esgotamento do bloco.

4.7. MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO HISTOLÓGICA

Hematoxilina - Eosina

Para a análise histopatológica geral foi utilizada a coloração clássica de Hematoxilina – Eosina em cortes de tubas uterinas e de ovário.

Azul de Toluidina

O reconhecimento dos mastócitos foi feito através da coloração dos cortes em solução alcoólica Azul de Toluidina 1%. Com este procedimento os grânulos dos mastócitos exibem cor púrpura devido à metacromasia.

Marcação pela Lectina DBA

O reconhecimento das células NKu foi feito seletivamente pela marcação com Lectina DBA (obtida de *Dolichos biflorus*), biotinada em 1µl DBA/600µl PBS, segundo Paffaro et al. (2003). O procedimento técnico foi aprendido no Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, sob supervisão do Prof. Dr. Áureo Yamada, conforme o protocolo resumido a seguir:

Os cortes coletados em lâminas silanizadas foram submetidos a 3 banhos em xilol, (10 minutos cada), banhos em álcool 100%, 95%, 80% e 70% (10 minutos cada) e imersão em água destilada ultrapura, por 5 minutos. A seguir, foram lavados PBS 0,02M pH 7,4. A solução de peroxidase endógena 0,3% em PBS foi aplicada sobre os cortes por 45 minutos para bloquear compartimentos que contenham o peróxido. Em seguida os cortes foram lavados na mesma solução de PBS e foi aplicado o bloqueio com BSA (albumina bovina sérica) 1% em PBS pH 6,8, por 45 minutos. A seguir, foi colocada a solução de Lectina DBA biotinada em 1µl DBA/600µl PBS sobre os cortes. Os cortes foram, então, encubados em câmara úmida, na geladeira, *overnight*. No dia seguinte, as lâminas foram

deixadas por 45 minutos a temperatura ambiente e lavadas com solução de PBS. Após a secagem da região vizinha do corte histológico, aplicou-se o complexo estreptoavidina peroxidase 1:400µl de PBS pH7, por 45 minutos. A seguir, os cortes foram relavados em PBS pH7,4. A revelação da marcação foi feita pela diaminobenzindina (DAB) em H₂O₂, por 20 segundos. Por último, os cortes foram novamente lavados e os núcleos foram corados com Hematoxilina de Harris por 15 segundos, passados por 15 segundos em solução aquosa de carbonato de lítio e procedeu-se à montagem de rotina das lâminas.

As lectinas são proteínas ou glicoproteínas derivadas principalmente de sementes de vegetais que se ligam com alta afinidade e especificidade a carboidratos. Diferentes lectinas interagem com diferentes açúcares ou sequências de açúcares, ligando-se, portanto, a glicoproteínas, proteoglicanos e glicolipídios; são muito usadas para caracterizar moléculas de membranas celulares que contem sequências específicas de açúcares. Durante o procedimento de marcação, a estreptoavidina vai se ligar à lectina biotinada e marcar o peróxido das membranas celulares com a coloração marrom. Nas células NK, os peróxidos são encontrados na membrana celular e nas membranas dos seus grânulos (Zhang et al., 2010).

Imunoistoquímica para marcação de macrófagos por Anti-Mouse Mac-2

A marcação imunoistoquímica dos macrófagos foi realizada no Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP, sob supervisão técnica de Ângela Batista

Gomes dos Santos. Os anticorpos Anti-Mouse MAC-2 foram cedidos pela Profa. Dra. Thais Mauad do mesmo Departamento.

Os cortes foram coletados em lâminas silanizadas e desparafinados em xilol e hidratados em álcool. Em seguida, ocorreu o bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada 10V 3% por 4 vezes de 5 minutos cada e a lavagem com água e TBS.

A recuperação antigênica foi obtida através de alta temperatura por 1 minuto em panela de pressão a 121°C. Após este período, as lâminas foram lavadas em TBS. O anticorpo primário Anti-Mouse Mac-2 (CL 8942AP Cedarlane Laboratories Ltda) título 1:50.000 foi diluído em BSA e aplicado sobre os cortes que foram, a seguir, incubados “overnight”. Para o controle negativo foi usado apenas BSA. As lâminas foram relavadas em TBS e incubadas com o anticorpo secundário ABC Kit Vectastain (Vector Elite PK-6104) por 30 minutos a 37°C. Após lavagem em TBS, seguiu-se a revelação pelo cromógeno 3,3 Diaminobenzidine (DAB) (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA). Finalmente os cortes foram lavados abundantemente em água corrente, contra-corados com Hematoxilina de Harris e, após lavagem em água corrente, as lâminas foram montadas segundo procedimento de rotina.

4.8. ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DO VOLUME DO SÍTIO IMPLANTACIONAL

O volume total dos sítios embrionários e o volume total de cada compartimento (estroma endometrial, e miométrio) foram estimados utilizando o Princípio de Cavalieri (Gundersen and Jensen, 1987). A coloração do HE foi escolhida, pois se identificam facilmente o estroma endometrial e o miométrio. Um a cada três cortes histológicos foi fotografado usando a objetiva 4x, de maneira tal que a distância entre cada corte analisado era de 150 µm. Para captação da imagem utilizou-se um sistema composto por um microscópio Nikon Eclipse E600 acoplado a uma câmara de vídeo digital Nikon DXM1200F. Imagens digitais de alta resolução foram gravadas pelo programa Nikon ACT-1 em um microcomputador acoplado ao sistema.

A seguir, as imagens obtidas foram transferidas para o programa Image J, do National Institute of Health (USA), para facilitar o armazenamento dos dados obtidos (Papadopoulos et al., 2007). Um retículo de pontos, com uma área relacionada a cada ponto de 0,0015 mm², foi sobreposto às imagens (Figura 7) e foram contados os pontos (P) que incidiram sobre cada compartimento (estroma endometrial ou miométrio). A seguinte fórmula foi utilizada para estimar os volumes:

$$V_{\text{compart}} = \sum P \times a_p \times T ,$$

onde, o $\sum P$ é a somatória dos pontos incidentes sobre cada compartimento, T é a distância entre os cortes 150µm. [T= t x i, onde t é a

espessura de cada corte ($5\text{ }\mu\text{m}$) e i é o número de seções entre cada corte analisado (30)].

Figura 7: Fotomicrografia do sítio de implantação no 8º dia pós coito mostrando o retículo de pontos sobreposto à imagem histológica.

O volume total do sítio implantacional foi obtido pela soma dos volumes de cada compartimento:

$$V_{\text{sítio implant}} = V_{\text{estroma}} + V_{\text{miométrio}} ,$$

Para cada compartimento foi calculado o seu volume relativo no sítio como um todo.

4.9. ANÁLISE DA DENSIDADE NUMÉRICA E DO NÚMERO ABSOLUTO DE CÉLULAS NK UTERINAS NO SÍTIO IMPLANTACIONAL

A população de células NK pode ser identificada apenas aos 8dpc. Sua densidade numérica foi avaliada pelo método do *disector* (Sterio, 1984).

Para tal, as células foram marcadas seletivamente com Lectina DBA para sua identificação nos cortes histológicos.

Com a objetiva de 20x, foram obtidas fotomicrografias da mesma região do estroma mesometrial em 2 cortes adjacentes. Cada par de imagens constituiu um *disector*. Foi calculada a área de estroma endometrial em cada corte e a distância entre os cortes foi considerada a espessura do corte (5µm). Foram avaliados de 16 *disectors* para cada sítio implantacional.

Uma vez conhecida a densidade numérica, calculou-se o número total de células NK no estroma endometrial , segundo a equação:

$$N = N_v \times V_{\text{estroma}}$$

4.10. ANÁLISE DA DENSIDADE NUMÉRICA E DO NÚMERO ABSOLUTO DE CÉLULAS DE MACRÓFAGOS NO SÍTIO IMPLANTACIONAL

A população de macrófagos foi avaliada pelo método do *disector* (Sterio, 1984) aos 6 dpc. As células foram marcadas por imunistoquímica para sua identificação nos cortes histológicos.

Assim como para a avaliação das NK uterinas, com a objetiva de 20x, foram obtidas fotomicrografias da mesma região do estroma mesometrial em 2 cortes adjacentes. Cada par de imagens constituiu um *disector*. Foi calculada a área de estroma endometrial em cada corte e a distância entre os cortes foi considerada a espessura do corte (5µm). Foram avaliados de 14 *disectors* para cada sítio implantacional.

Uma vez conhecida a densidade numérica de macrófagos, calculou-se o número total macrófagos no estroma endometrial, segundo a equação:

$$N = N_v \times V_{\text{estroma}}$$

4.11. ANÁLISE DA DENSIDADE NUMÉRICA DE MASTÓCITOS POR ÁREA NO SÍTIO IMPLANTACIONAL

Os mastócitos foram identificados pela presença de seus grânulos corados em púrpura metacromaticamente com o azul de toluidina.

O sítio de implantação foi dividido em quatro quadrantes. Para cada corte histológico foi sorteado um dos quadrantes para ser fotografado com a objetiva de 20x. Com o auxílio do programa Image J, foi sobreposto à imagem um retículo de pontos cuja área associada a cada ponto era conhecida, o que permitiu o cálculo da área de tecido contida em cada quadrante pela simples contagem de pontos incidentes. Dentro desta área, contou-se o número de mastócitos presentes.

4.12. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Toda análise estatística foi realizada utilizando-se os softwares estatísticos SPSS 17. Médias e desvios padrões (SD) foram calculados para cada grupo.

Teste t pareado de Student foi utilizado para se realizar as comparações dos valores da concentração de material particulado entre as câmaras. Os parâmetros de acasalamento e de fertilidade, por serem derivados de variáveis categóricas (fêmeas com ou sem plug, fêmeas com ou sem sítios implantacionais), foram comparados entre si pelo teste exato de Fisher. Os parâmetros implantacionais, os volumes dos compartimentos do sítio implantacional e os parâmetros quantitativos relativos às células estudadas foram comparados entre os grupos através do teste t de Student.

A hipótese nula foi rejeitada ao nível de probabilidade de $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. POLUIÇÃO DO AR

De quatro a cinco amostras por semana foram coletas durante o período de exposição para medir as concentrações de PM 2,5 nas câmaras F e NF. A média de concentração de PM 2,5 na câmara sem filtros foi de $27,5 \mu\text{g.m}^{-3}$ (CV = 44%). No entanto, o valor médio ($6.5 \mu\text{g.m}^{-3}$; CV = 49%) foi significativamente inferior nas câmaras com ar filtrado ($P < 0.001$), com uma redução média de 71% na concentração de PM_{2,5}. Os níveis médios de NO₂, CO e SO₂ ambientais foram $101 \mu\text{g.m}^{-3}$ (CV = 43%), $1.81 \mu\text{g.m}^{-3}$ (CV = 50%) e 7.66 ppm (CV = 64%), respectivamente.

5.2. PARÂMETROS DE ACASALAMENTO E DE FERTILIDADE

No experimento foram colocadas 24 fêmeas do grupo F e 25 do grupo NF para acasalar. Destas, apenas 17 do grupo F e 16 do grupo NF apresentaram o *plug* vaginal. O índice de acasalamento foi calculado pela porcentagem de fêmeas que exibiram o *plug* vaginal em relação ao número total de fêmeas em coabitação com machos férteis (Tabela 1). A análise estatística mostrou que não há diferenças significativas entre os grupos em relação ao índice de acasalamento.

O exame macroscópico da tuba uterina mostrou que em cada grupo 6 fêmeas não possuíam nenhum sítio implantacional apesar de terem apresentado *plug* vaginal. Assim sendo, o índice de fertilidade foi calculado pela porcentagem de fêmeas que apresentaram sítios implantacionais ao exame pós-eutanásia em relação ao número total de fêmeas que apresentaram *plug* vaginal.

Os valores obtidos para os parâmetros relativos ao acasalamento e fertilidade estão discriminados na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros de acasalamento e fertilidade em camundongos expostos na câmara filtrada e não filtrada.

	Filtrado	Não filtrado
No. fêmeas em coabitação com machos (a)	24	25
No. fêmeas com <i>plug</i> (b)	17	16
No. de fêmeas com sítios implantacionais* (c)	11	10
Índice de acasalamento (b/a) x100	70,8	64,0
Índice de fertilidade (c/b) x 100	64,7	62,5

(*) – soma de fêmeas eutanasiadas aos 6 dpc e aos 8 dpc.

A partir dos dados obtidos construíram-se as tabelas de contingência que descreveram o número de indivíduos em cada variável (Tabelas 2 e 3).

Tabelas 2 e 3 –Tabelas ilustrativas das comparações e dos resultados obtidos pelo Teste de Fisher para acasalamento e fertilidade em camundongos expostos na câmara filtrada e não filtrada. p = valor p resultante do Teste de Fisher.

Grupos	Acasalamento		Grupos	Fertilidade	
	Fêmeas sem plug	Fêmeas com plug		Fêmeas sem sítio implantacional	Fêmeas com sítio implantacional
Filtrado	7	17	Filtrado	7	11
Não filtrado	9	16	Não filtrado	6	10
p = 0,76			p = 1,00		

Assim sendo, o resultado do Teste Exato de Fisher mostrou que não há uma associação entre estar exposto ao ar de São Paulo na câmara não filtrada e apresentar um pior desempenho nos índices de acasalamento e de fertilidade.

5.3. PERDA PRÉ-IMPLANTACIONAL

O número de sítios de implantação em cada animal, o número de corpos lúteos dos ovários foram usados para calcular o índice de perdas pré-implantacionais. As médias finais (mostradas na Tabela 4) são resultantes dos valores obtidos dos animais de 6 e 8 dpc em conjunto, uma vez que o evento avaliado (perda pré-implantacional) ocorreu até o 4 dpc e pode ser avaliado em qualquer idade gestacional. O resultado mostra que houve significativamente mais perdas pré-implantacionais na câmara que recebeu ar ambiental sem filtragem.

Tabela 4: Parâmetros implantacionais, expressos como média $\pm$ desvio padrão, em camundongos fêmeas expostos na câmara filtrada e não filtrada. P = valor p resultante do Teste t de Student.

	Filtrado	Não filtrado	p
No. sítios de implantação / fêmea* (a)	4,10 $\pm$ 0,5	3,00 $\pm$ 0,5	0,07
No. de corpos lúteos / fêmea (b) *	7,07 $\pm$ 2,36	7,41 $\pm$ 1,38	0,89
Índice de perda pré-implantacional [(b – a) / b] x100	40 $\pm$ 16	60 $\pm$ 11	0,02

(*) – soma dos resultados para as fêmeas eutanasiadas aos 6 dpc e aos 8 dpc.

5.4. PERDA PÓS-IMPLANTACIONAL

À medida que os sítios foram cortados para estudo histológico se percebeu que alguns deles apresentavam características de reabsorção com perda da organização característica do desenvolvimento embrionário normal. A Tabela 5 mostra o número de sítios em reabsorção encontrados em cada grupo.

Tabela 5: Dados obtidos para reabsorção pósimplantacional em camundongos fêmeas expostos na câmara filtrada e não filtrada.

	Filtrado		Não filtrado	
	6 dpc	8dpc	6 dpc	8dpc
No. sítios de implantação	24	20	15	15
No. sítios em reabsorção	2	2	1	5
Taxa reabsorção (%)	8,3	10	6,6	33,3

Nos animais eutanasiados aos 6 dias a taxa de reabsorção pós-implantacional foi semelhante entre as câmaras de exposição. No entanto, observou-se que aos 8 dias dpc as fêmeas da câmara não filtrada apresentavam uma taxa de reabsorção cerca 3 vezes maior que nos animais da câmara filtrada.

5.5. ANÁLISE ESTEREOLÓGICA DO VOLUME DO SÍTIO IMPLANTACIONAL

Cortes histológicos dos sítios implantacionais corados com Hematoxilina–eosina obtidos aos 6 dpc e 8 dpc foram analisados estereologicamente para cálculo de volume por Cavalieri.

Foi possível reconhecer em todos os preparados as regiões correspondentes ao estroma endometrial (com algumas regiões em processo de decidualização), ao miométrio e ao perimétrio. Também o embrião e o cone placentário foram localizados em todos os sítios implantacionais utilizados para as análises morfométricas deste trabalho

A Figura 8 ilustra o aspecto histológico dos cortes corados com HE aos 8 dpc.

Figura 8 – Fotomicrografia obtida com a objetiva de 4x representativa da aparência histológica dos sítios implantacionais corados com HE aos 8 dpc. A seta aponta para o embrião implantado no pólo antimesometrial (AM) do estroma endometrial (EE); a região delimitada pela linha tracejada é cone placentário (que corresponde ao trofoblasto em desenvolvimento crescendo na direção mesometrial (M). Na periferia do sítio implantacional se encontram as camadas de células musculares lisas do miométrio (MI).

O resultados obtidos para o volume do sítio implantacional total e para cada um dos seus compartimentos (estroma endometrial e miométrio), para as fêmeas eutanasiadas no 6 dpc ou no 8 dpc, estão discriminados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Os parâmetros volumétricos do sítio implantacional e seus compartimentos são equivalentes aos 6 dpc nas duas câmaras. No entanto, aos 8 dpc, o volume total do sítio implantacional e o volume do endométrio são menores nos animais expostos na câmara não filtrada

Tabela 06: Parâmetros de desenvolvimento do sítio implantacional, expressos como média $\pm$ desvio padrão, em camundongos fêmeas expostos na câmara filtrada e não filtrada e eutanasiadas aos **6 dias** pós-coito. P = valor p resultante do Teste t de Student..

	Filtrado	Não filtrado	<i>p</i>
Volume estroma endometrial (Vest, mm ³)	0,72 $\pm$ 0,27	0,80 $\pm$ 0,21	0,51
Volume miométrio (Vmio, mm ³)	0,55 $\pm$ 0,18	0,69 $\pm$ 0,19	0,20
Volume total sítio implantacional (Vt, mm ³)	1,27 $\pm$ 0,44	1,50 $\pm$ 0,39	0,32
Vest / Vt x 100 (%)	0,44 $\pm$ 0,04	0,46 $\pm$ 0,04	0,40
Vmio / Vt x 100 (%)	0,55 $\pm$ 0,04	0,53 $\pm$ 0,04	0,40

Tabela 07 - Parâmetros de desenvolvimento do sítio implantacional, expressos como média $\pm$ desvio padrão, em camundongos fêmeas expostos na câmara filtrada e não filtrada e eutanasiadas aos **8 dias** pós-coito. P = valor p resultante do Teste t de Student..

	Filtrado	Não filtrado	<i>p</i>
Volume estroma endometrial (Vest, mm ³)	3,55 $\pm$ 0,65	2,09 $\pm$ 0,25	0,02
Volume miométrio (Vmio, mm ³)	1,67 $\pm$ 0,27	1,34 $\pm$ 0,13	0,69
Volume total sítio implantacional (Vt, mm ³)	5,22 $\pm$ 1,10	3,44 $\pm$ 0,30	0,01
Vest / Vt x 100 (%)	67 $\pm$ 3	60 $\pm$ 3	0,03
Vmio / Vt x 100 (%)	33 $\pm$ 4	40 $\pm$ 3	0,03

5.6. ANÁLISE DA DENSIDADE NUMÉRICA E DO NÚMERO ABSOLUTO DE CÉLULAS NK UTERINAS NO SÍTIO IMPLANTACIONAL

A marcação seletiva das células NK uterinas pelo método da lectina DBA permitiu estabelecer sua presença na região mesometrial no sítio implantacional dos animais sacrificados aos 8 dpc, como mostra a Figura 10. Nos sítios obtidos 6 dpc não foi possível detectar a marcação para células NK uterinas.

Figura 9. Fotomicrografias representativas da aparência histológica dos sítios implantacionais tratados Lectina DBA aos 8 dpc. À esquerda: imagem obtida com a objetiva de 4 x mostrando a concentração de marcação na região antimesometrial. À direita: imagem obtida com a objetiva de 40x correspondente à área demarcada na imagem da esquerda mostrando as células NKs uterinas marcadas em castanho.

Os resultados obtidos da aplicação dos disectors para cálculo da densidade numérica (Nv) e número absoluto de das células NK uterinas no endométrio estão mostrados na Tabela 8.

Os sítios implantacionais das fêmeas da câmara não filtrada apresentaram valores significativamente menores de densidade numérica e menor número total de NK que quando comparadas à câmara filtrada.

Tabela 8- Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão da densidade numérica e número absoluto de células NK uterinas no estroma endometrial em camundongos fêmeas expostos na câmara filtrada e não filtrada e eutanasiadas aos **8 dias** pós-coito. P = valor p resultante do Teste t de Student..

	Filtrado	Não filtrado	<i>p</i>
Densidade numérica (nº/mm ³)	3613,6 $\pm$ 295,29	2880,6 $\pm$ 351,63	0,05
Número absoluto de células	13005,6 $\pm$ 4465,30	6195,0 $\pm$ 286,62	0,04

5.7. ANÁLISE DA DENSIDADE NUMÉRICA E DO NÚMERO ABSOLUTO DE MACRÓFAGOS NO SÍTIO IMPLANTACIONAL

A marcação imunoistoquímica dos macrófagos permitiu identificar sua presença no sítio implantacional dos animais sacrificados aos 6 dpc. Problemas de natureza técnica impediram a identificação fidedigna destas células aos 8 dpc.

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos da aplicação dos disectors para cálculo da densidade numérica (Nv) e número absoluto de macrófagos no estroma endometrial.

Os sítios implantacionais das fêmeas da câmara não filtrada e da câmara filtrada apresentaram valores equivalentes de densidade numérica e número total de macrófagos.

Tabela 9- Valores expressos como média $\pm$ desvio padrão da densidade numérica e número absoluto de macrófagos no estroma endometrial em camundongos fêmeas expostos na câmara filtrada e não filtrada e eutanasiadas aos **6 dias** pós-coito. P = valor p resultante do Teste t de Student..

	Filtrado	Não filtrado	<i>p</i>
Densidade numérica (nº/mm ³)	2231,0 $\pm$ 689,42	2558,75 $\pm$ 471,79	0,73
Número absoluto de células	45700,33 $\pm$ 16557,90	42453,0 $\pm$ 7087,20	0,63

5.8. ANÁLISE DA DENSIDADE NUMÉRICA DE MASTÓCITOS POR ÁREA NO SÍTIO IMPLANTACIONAL

Os mastócitos puderam ser localizados somente na região do miométrio e na periferia mais externa do estroma endometrial aos 6 dpc e aos 8dpc nos sítios implantacionais dos animais da câmara filtrada e não filtrada (Figura 9).

Figura 10 – .Fotomicrografia obtida com a objetiva de 20x representativa da aparência histológica dos sítios implantacionais corados com azul de toluidina aos 8

dpc. Os mastócitos aparecem circundados em vermelho. EE: estroma endometrial; MI: miométrio

Os resultados obtidos pela avaliação da densidade de mastócitos por área se encontram na tabela 06.

Tabela 06: Densidade de mastócitos por área no sítio implantacional de camundongos fêmeas expostos na câmara filtrada e não filtrada e eutanasiadas aos 6 e 8 dias pós-coito. p = valor p resultante do Teste t de Student.

	Ar filtrado	Não filtrado	p
6dpc	8,12 ± 0,91	6,72 ± 1,62	0,036
8dpc	13,53 ± 5,94	13,0 ± 2,15	0,89

Os resultados mostram que aos 6 dpc a densidade numérica de mastócitos é significativamente menor nos sítios implantacionais de fêmeas da câmara não filtrada quando comparada com a câmara filtrada. Esta diferença não pode ser encontrada aos 8 dpc, quando a densidade numérica de mastócitos por área é equivalente nos sítios implantacionais das fêmeas dos dois grupos.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho investigaram-se os efeitos dos níveis ambientais na poluição do ar gerada pelo tráfego veicular na implantação embrionária no início da gestação de camundongos.

Trabalhos anteriores nos mostram que a poluição do ar, ou seus componentes (Squadrito et al., 2001; Kok et al., 2006; Hogervorst et al., 2006), desregulam as funções reprodutivas, interferindo assim no processo reprodutivo.

Um dos achados do presente trabalho foi que não há uma associação entre estar exposto ao ar de São Paulo e apresentar um pior desempenho nos índices de acasalamento e de fertilidade.

No trabalho de Veras et al (2009) observou-se que casais expostos a poluição do ar, precisam de mais tempo para acasalar do que aqueles que ficaram em câmaras onde o ar era filtrado.

Neste estudo observamos um resultado diferente já que no trabalho de Veras o casal era exposto, e neste estudo somente as fêmeas foram expostas. Estudos mostram que a exposição de machos a produtos químicos e drogas pode resultar em anormalidade nos embriões de roedores e aumentar os índices de perdas pré-implantacionais (Kacew, 1987; Hales e Robaire, 2001).

Estudo conduzido na República Checa, (Rubes et al., 2005) avaliou parâmetros qualitativos no sêmen de humano após período de

exposição à poluição do ar em alta e em baixa concentração, e verificou que a exposição à poluição do ar diminui a motilidade espermática, diminui a proporção de espermatozóides com o formato da cabeça normal, e aumenta a proporção de espermatozóides com cromatina anormal, atribuindo assim estes resultados ao aumento da infertilidade em homens e maior incidência de abortos espontâneos.

Observa-se uma diminuição no número de sítios de implantação, e no índice de fertilidade e aumento no número de perdas pós implantacionais no 8º dpc em animais expostos a poluição do ar

O útero e o embrião precisam estar prontos, e a sincronia entre eles é crucial para o sucesso gestacional (Cummings and Perreault, 1990). A preparação do endométrio uterino para a implantação embrionária é controlada pelo estrógeno e estimulada pela progesterona (Paria et al., 1998). E o sistema endócrino e o sistema imunológico interagem intimamente na implantação e na manutenção da gravidez (Dekel N et al., 2010).

Neste trabalho sugerimos que a diminuição no número de sítios de implantação ocorreu pelo desequilíbrio observado nas células do sistema imunológico, mastócito e NKu, no 6º e 8º dia de gestação. Os animais expostos a poluição do ar tiveram uma redução do número dessa célula que promovem a angiogênese e produzem citocinas, tão necessárias para o desenvolvimento da decídua. No perimétrio, miométrio e na cervix uterina, os mastócito são encontrados em volta de vasos sanguíneos e linfáticos e de nervos (Jeziorska et al., 1995; Mori et al., 1997; Cabanillas-Saez et al.,

2002). E uma gravidez bem-sucedida requer um suprimento vascular ideal para o crescimento e desenvolvimento fetal, e essa diminuição do número dos mastócitos pode fazer com que o haja o comprometimento no remodelamento vascular uterino, impedindo o desenvolvimento do sítio implantacional até o 8º dia de gestação.

A diminuição do índice de fertilidade ocorre pela exposição a componentes da poluição do ar, como visto no trabalho de (Maluf et al., 2009), onde viu-se que a exposição ao material particulado traz efeitos negativos no desenvolvimento do embrião e na implantação do embrião. Estudos realizados em animais e humanos, diz que componentes da poluição do ar, como os metais pesados, chumbo, cádmio, estrogênio e partículas de exaustão do diesel, suprime ou interfere com a regulação do eixo hipotálamo-hipófise, em machos e fêmeas (Mattison e Thomford, 1989; Hoyer e Sipes, 1996; Takeda et al., 2004; Telisman et al., 2007), afetando consequentemente as glândulas reprodutivas (Tsukue et al., 2001).

E estudo realizado por Detmar e Jurisicova (2009) também mostra que concentrações baixas de HPA (hidrocarbonetos policíclico aromático encontrado no MP) aumenta o número de reabsorções em camundongos (aborto espontâneo).

A exposição prévia das fêmeas e durante os primeiros dias da gestação comprometeu o desenvolvimentos dos compartimentos uterinos, reduzindo o volume total da endométrio/decídua, assim como o volume total do sítio de implantação. Demonstrando que os efeitos negativos da exposição não afetaria somente o peso ao nascer, mas também afetaria a

decidualização e conseqüentemente o desenvolvimento do embrião nos primeiros dias da gestação.

Este atraso no desenvolvimento do sítio implantacional pode estar associado a diminuição das células imunológicas avaliadas, já que estudos mostram que os mastócitos e seus produtos, como a histamina, podem participar do desenvolvimento placentário através da regulação do crescimento e invasão do trofoblasto (Szukiewicz et al., 1999). Com a alteração encontrada no 6º dia, podemos sugerir que estes sítios que são encontrados com o número de mastócitos reduzidos, atrasam o desenvolvimento do sítio implantacional.

As células NKu, presentes a partir do 6,5 a 7,5 dia de gestação em roedores são uma subpopulação de linfócitos, que produz citocinas essenciais para a formação da placenta e para o desenvolvimento, diferenciação das células do trofoblasto tão essenciais para o progresso da gestação. Na avaliação do número total das células NKu, observamos uma tendência na diminuição das mesmas ($p=0,08$) nos animais expostos a poluição do ar.

Estes achados mostram que as células NK são as principais reguladoras do remodelamento vascular durante os primeiros estágios da gestação. A capacidade das células NK de secretar esta variedade de citocinas que dão suporte para o desenvolvimento da gestação sugere que as células NK precisam “estar ativas” no tecido, ao invés de inibidas, para exercer um papel construtivo na interface materno fetal e estabelecer uma gestação normal.

Ainda, Hanna em (2006), sugere que as células NKu também estão envolvidas com a diferenciação e invasão do trofoblasto, corroborando assim com os nossos resultados na diminuição no número das células trofoblasticas na decídua de camundongos expostos a poluição do ar.

Estudo que expôs ratos ao estradiol mostra que há indução da degeneração dos trofoblastos, incluindo a apoptose e destruição da região do labirinto placentário (Matsuura et al., 2004)

Já o aumento do volume de glândulas de sítios no 8ºdpc é maior em animais expostos a poluição, já que seu suprimento/abastecimento/ ainda não está estabelecido totalmente pelo trofoblasto e pelas células decíduais, precisando ainda das glândulas para a manutenção da decídua

Diminuição de células do sistema imunológico: mastócito e NKu: Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA), tais como BAP e DMBA são conhecidos como supressores imunológicos em humanos e camundongos (Burchiel e Luster 2001). E neste trabalho observamos a supressão imunológica, já que observamos a diminuição do número de mastócito e de NKu. Os mastócitos produzem, armazenam e liberam muitos tipos de mediadores químicos, incluindo histamina, triptases, quimases, heparina, proteoglicanos, fatores de crescimento, (bFGF, VEGF, e TGF- β), e citocinas (TNF- α , IL-6, e IL-8). Estas citocinas podem estar associadas à angiogênese. (Ribatti et al. 2001). E neste trabalho observamos que como a diminuição do número de mastócito no 6ºdpc trouxe efeitos negativos para o desenvolvimento do embrião.

A mesma diminuição de NKu foi encontrado no trabalho de Burchiel e Luster (2001), onde a administração por via oral ou por via subcutânea de BAP e DMBA em altas doses (50-150mg/Kg), pode suprimir tanto o sistema imunológico humoral como imunidade celular (Booker e Branco 2005; Dean et al., 1986; Ward et al., 1984). Já em baixas doses de HPAs, há o aumento da resposta imunológica, levando o IgE aumentar a produção de citocinas e ativação de macrófagos (Burchiel e Luster 2001).

Estudos mostram que até a formação placentárias as NKu expandem o volume do citoplasma e secretam IFN-g (Croy et al., 2003a), TNF- α (Wu et al., 2006), VEGF, e fatores placentários (Hanna et al., 2006). Estabelecendo assim o papel crucial destas células na placentação de camundongos (Croy et al., 2003b).

Alguns trabalhos estudam as células NKu no 12º dia de gestação, já que neste dia se encontra o número máximo de células, e depois desse período a placenta começa produzir as citocinas produzidas pela NK, e o número dessa célula diminui. Porém, já no 8º dia de gestação as células NK uterinas se proliferam no triângulo mesometrial (Croy et al., 2006).

Em camundongos Knockout, a ausência de NK uterina resulta em uma má formação da artéria espiralada no período 9-10 dpc (Adamson et al., 2002). Há estudos que confirmam que em camundongos como em humanos, a formação da artéria espiralada ocorre antes da chegada de trofoblasto naquela região (Bulmer e Lash, 2005; Adamson et al., 2002; Smith et al., 2009). Estudos em roedores demonstram que a secreção de

interferon gama pelas uNK fornece o sinal para que as artérias espiraladas se transformem de vasos constritos, musculares e vasoativos em vasos dilatados e de paredes finas, semelhantes a veias (Zhang et al., 2011).

Devido à mesma má formação das artérias espiraladas em mulheres com pré-eclâmpsia, que apresentam hipertensão e excreção de proteínas, fica claro que a formação adequada das artérias espiraladas é essencial para a manutenção da pressão arterial durante a gestação (Dokras et al., 2006; Burke et al., 2010)

Em conclusão, nossos dados sugerem que a poluição particulada urbana aumenta as falhas de implantação embrionária e prejudica o desenvolvimento decidual e placentário por desregular o balanceamento das células imunológicas.

Uma vez que o material particulado pode ser encontrado em qualquer ambiente, os resultados deste estudo têm o potencial de se tornar realidade a um número muito grande de pessoas, podendo estimular a criação de concentrações permitidas de poluentes que reduzam estes efeitos negativos, e se criar uma fiscalização mais rígida sobre o controle da poluição do ar nos municípios do Estado de São Paulo.

O desenvolvimento normal da gestação é possível pela regulação do sistema imune materno na interface materno-fetal, o que resultará na tolerância do feto, que pode ser entendido como um enxerto semi-alogênico. Acredita-se que a perda desta regulação do sistema imune materno possa resultar em perdas fetais e formação precária da placenta pela rejeição dos tecidos fetais

7. CONCLUSÕES

1) A exposição prévia da fêmea não altera o índice de acasalamento e de fecundidade das fêmeas.

2) A exposição dos animais à poluição atmosférica se associa significantivamente a:

- maior índice de perdas pré-implantacionais
- maior porcentagem de reabsorção de dos sítios embrionários aos 8 dias pós-coito
- menor volume do estroma endometrial
- menor volume do sítio implantacional
- menor número e densidade de células NKu no estroma endometrial aos 8 dias pós-coito.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ansell JD, Barlow PW, McLaren A. Binucleate and polyploid cells in the decidua of the mouse. *J Embryol Exp Morphol.* 1974; 31(1):223-7.
- Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med.* 2000; 17;192(2):259-70.
- Ashkar AA, Black GP, Wei Q, He H, Liang L, Head JR, Croy BA. Assessment of requirements for IL-15 and IFN regulatory factors in uterine NK cell differentiation and function during pregnancy. *J Immunol.* 2003. 15;171(6):2937-44.
- Billington WD. Biology of trophoblast. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Adv. Reprod. Physiol.* 1971; 5:27-66.
- Blois SM, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA, Arck PC. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med.* 2007; 13(12):1450-7.
- Bosquiaz VL, Ramos JG, Varayoud J, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. Mast cell degranulation in rat uterine cervix during pregnancy correlates with expression of vascular endothelial growth factor mRNA and angiogenesis. *Reproduction.* 2007; 133(5):1045-55.
- Buck Louis GM., Lynch CD., Cooney MA. Environmental influences on female fecundity and fertility. *Semin Reprod Med.* 2006; 24(3): 147-55.
- Cabanillas-Saez A, Schalper JA, Nicovani SM, Rudolph MI. Characterization of mast cells according to their content of tryptase and chymase in normal and neoplastic human uterine cervix. *Int J Gynecol Cancer.* 2002;12: 92-98.
- Carson DD, Bagchi I, Dey SK, Enders AC, Fazleabas AT, Lessey BA, Yoshinaga K. Embryo implantation. *Dev Biol.* 2000; 15;223(2):217-37.
- Chang HH, Reich BJ, Miranda ML. Time-to-event analysis of fine particle air pollution and preterm birth: results from North Carolina, 2001-2005. *Am J Epidemiol.* 2012; 15;175(2):91-8
- Chhabra A, Lechner AJ, Ueno M, Acharya A, Van Handel B, Wang Y, Iruela-Arispe ML, Tallquist MD, Mikkola HK. Trophoblasts regulate the placental hematopoietic niche through PDGF-B signaling. *Dev Cell.* 2012; 13;22(3):651-9.
- Chapin RE; Buck GM. Our Once-in-a-lifetime opportunity. *Environ Health Perspect.* 2004;112:67-68.
- Clark DA. Prostaglandins and immunoregulation during pregnancy. *Am J Reprod Immunol Microbiol.* 1985; 9(4):111-2.
- Colucci F, Caligiuri MA, Di Santo JP. What does it take to make a natural killer (interrogação). *Nat Rev.* 2003; 3,413-425.

- Crowe SE, Perdue MH. Functional abnormalities in the intestine associated with mucosal mast cell activation. *Reg Immunol.* 1992; 4(2):113-7.
- Croy BA, Kiso Y. Granulated metrial gland cells: a natural Killer cell subset of the pregnancy murine uterus. *Microsc Res Tech.* 1993; 25: 189-200.
- Croy BA, Di Santo JP, Greenwood JD, Chantakru S, Ashkar AA. Transplantation into genetically alymphoid mice as an approach to dissect the roles of uterine natural killer cells during pregnancy--a review. *Placenta.* 2000; 21 Suppl A:S77-80.
- Croy BA, Van Den Heuvel MJ, Borzchowski AM, Tayade, C. Uterine Natural Killer cells: a specialized differentiation regulated by ovaian hormones. *Immunol. Rev.* 2006; 214:161-185.
- Gauderman WJ., et al. Association between air pollution and lung function growth in southern California children. *American journal of respiratory and critical care medicine.* 2000; 162:1383-1390.
- Gendron RL, Baines MG. Infiltrating decidual natural killer cells are associated with spontaneous abortion in mice. *Cell Immunol.* 1988;113(2):261-7.
- Gillman MW. Epidemiological challenges in study the fetal origins of adult chronic disease. In *J Epidemiol.* 2002; 31:294-299.
- Glasser SR, Mulholland J, Mani SK, et al. Blastocyst-endometrial relationship: reciprocal interactions between uterine epithelial and stroma cells and blastocyst. *Trophoblast Research.* 1991; 5,229-280.
- Glinianaia SV; Rankin Judith; Bell R; Pless-Mulloli T; Howel D. Does particulate air pollution contribute to infant death? A systematic review. *Environ Health Perspect.* 2004a; 112(14):1365-1370.
- Glinianaia SV; Rankin J; Ruth Bell; Pless-Mulloli T.;Howel D. Particulate air pollution and fetal health: a systematic of the epidemiologic evidence. *Epidemiology.* 2004b; 15(1):36-45.
- Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero, P. The aryl hydrocarbon receptor. *Drug metabolism and disposition.* 1998; 26(12):1194-1198.
- Grabher, C et al. Brith and life of tissue macrophages and their migration in embryogenesis and inflammation in medaka. *Journal of Leukocyte Biology.* 2007; 81:263-271.
- Hanna J; et al. Decidual NK cells regulate key developmental processes at the human fetal-maternal interface. *Nat Nature.* 2006; 12 (9):1065-74.
- Hanna J, Mandelboim O. When killers become helpers. *Trends Immunol.* 2007; 28:201-206.
- Holstius DM, Reid CE, Jesdale BM, Morello-Frosch R. Birth Weight Following Pregnancy During the 2003 Southern California Wildfires. *Environ Health Perspect.* 2012; May 29.
- Jensen F, Woudwyk M, Teles A, Woidacki K, Taran F, Costa S, Malfertheiner SF, Zenclussen AC. Estradiol and progesterone regulate the migration of mast cells from the periphery to the uterus and induce their maturation and degranulation. *PLoS One.* 2010; 22;5(12):e14409.

- Jeziorska M, Salamonsen LA, Woolley DE. Mast cell and eosinophil distribution and activation in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Biol Reprod.* 1995; 53: 312-320.
- Jones ME; Simpson ER. Of mice and men: the many guises of estrogens. *Ernst Schering Found Symp Proc.* 2006; 1:45-67.
- Kanaiazuma M, Kanai Y, Kurohmaru M, Tachi C, Yazaki K, Hayashi Y. Giant cell transformation of trophoblast cells in mice. *Endocrine J.* 1994; 41:S33-41.
- Katz S, Abrahamsohn PA. Involution of the antimesometrial deciduas in the mouse (na ultrastructural study). *Anat Embryol.* 1987; 176:251-258.
- Kopcow HD, Allan DS, Chen X, Rybalov B, Andzelm MM, Ge B, Strominger JL. Human decidual NK cells form immature activating synapses and are not cytotoxic. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 25;102(43):15563-8.
- Krussel JS, Simon C, Rubio MC, Pape AR, Wen Y, Huang HY, et al. Expression of interleukin-1 system mRNA in single blastomeres from human preimplantation embryos. *Hum Reprod.* 1998; 13: 2206-2211.
- Lacasana M; Esplugues A; Ballester F. Exposure to ambient air pollution and prenatal and early childhood health effects. *Eur J Epidemiol.* 2005; 20(2): 183-199.
- Lash GE, Schiessl B, Kirkley M, Innes BA, Cooper A, Searle RF, Robson SC, Bulmer JN. Expression of angiogenic growth factor by uterine natural killer cells during early pregnancy. *J Leukoc Biol.* 2006; 80:572-580.
- Lawson CC., Shnorrr TM., Whelan EA., Deddens JA., Dankovic DA., Piacitelli LA., Sweeney MH., Connally LB. Paternal occupational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and birth outcomes of offspring: birth weigh, preterm delivery, and birth defects. *Environ Health Perspect.* 2004;112(14):1403-8.
- Lee, SL; Wang Y., Milbrandt J. Unimpaired macrophage differentiation and activation in mice lacking the zinc finger transcription factor NGFI-A (EGR1). *Molecular and Celular.* 1996; 4566-4572.
- Lim HJ, Wang H. Uterine disorders and pregnancy complications: insights from mouse models. *J Clin Invest.* 2010;120(4):1004-15
- Liu S., Krewski D., Shi Y, Chen Y., Burnett RT. Association between gaseous ambient air pollutants and adverse pregnancy outcomes in Vancouver, Canada. *Environ Health Perspect.* 2003; 111(14):1173-8.
- Logan MR, Odemuyiwa SO, Moqbel R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: the molecular basis of mediator secretion. *J Allergy Clin Immunol.* 2003; 111(5):923-32.
- Maisonet, M., Bush, T.J., Correa, A. and Jaakkola, J.J.K. Relation between ambient air pollution and low birth weight in the Northeastern United States. *Environmen. Health. Perspect.* 2001; 109:S351-356..
- Maisonet M; Correa A; Misra D; Jaakkola JJK. A reveiw of the literature on the effects os ambient air pollution on fetal growth. *Environ Research.* 2004; 95(1): 106-115.
- Mandarim-de-Lacerda, C. A.. Stereological tools in biomedical research. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 75, n.4: 469-486, 2003.

- Marshall JS, Jawdat DM. Mast cells in innate immunity. *J Allergy Clin Immunol*. 2004;114:21–27.
- Mas AE, Petitbarat M, Dubanchet S, Fay S, Ledée N, Chaouat G. Immune regulation at the interface during early steps of murine implantation: involvement of two new cytokines of the IL-12 family (IL-23 and IL-27) and of TWEAK. *Am J Reprod Immunol*. 2008;59(4):323-38.
- McDiarmid MA., Gehle K. Preconception brief: occupational/environmental exposure. *Matern Child Health J*. 2006; 10 Suppl 7:123-8.
- Metcalf DD, Baram D, Mekori YA. Mast cell. *Physiol Ver*. 1997; 77 (4):1033-79.
- Michailidou EZ, Markopoulos AK, Antoniadis DZ. VEGF expression from human dysplastic or malignant oral epithelium may be related to mast cell density and the subsequent angiogenetic phenomena. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2012 May 29
- Mocarelli P., Gerthoux PM., Ferrari E., Patterson DG Jr., Kieszak SM., Brambilla P., Vincoli N., Signorini S., Tramacere P., Carreri V., Sampson EJ., Turner WE., Needham LL. Paternal concentrations of dioxin and sex ratio of offspring. *Lancet*. 2000; 355(9218): 1858-63.
- Moffet-King, A. Natural Killer cells and pregnancy. *Nat Rev. Immunol*. 2002; 2:656-663.
- 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.
- Mori A, Nakayama K, Suzuki J, Nikaido T, Isobe M, Fujii S. Analysis of stem cell factor for mast cell proliferation in the human myometrium. *Mol Hum Reprod*. 1997; 3: 411-418.
- Muntener M, Hsu TC. Developmental of trophoblast end placenta of the mouse. *Acta Anat*. 1977; 98:241-252.
- Nakashima A, Shima T, Inada K, Ito M, Saito S. The balance of the immune system between T cells and NK cells in miscarriage. *Am J Reprod Immunol*. 2012; 67(4):304-10.
- Oei JL, Kingsbury A, Dhawan A, Burns L, Feller JM, Clews S, Falconer J, Abdel-Latif ME. Amphetamines, the pregnant woman and her children: a review. *J Perinatol*. 2012 May 31.
- Ortega-García JA, Gutierrez-Churango JE, Sánchez-Sauco MF, Martínez-Aroca M, Delgado-Marín JL, Sánchez-Solis M, Parrilla-Paricio JJ, Claudio L, Martínez-Lage JF. Head circumference at birth and exposure to tobacco, alcohol and illegal drugs during early pregnancy. *Childs Nerv Syst*. 2012; 28(3):433-9.
- Papadopoulos F, Spinelli M, Valente S, Foroni L, Orrico C, Alviano F, Pasquinelli G. Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using ImageJ. *Ultrastruct Pathol*. 2007 Nov-Dec;31(6):401-7.
- Paffaro VA Jr; Bizinotto MC; Joazeiro PP; Yamada AT. Subset classification of mouse uterine natural killer cells by DBA lectin reactivity. *Placenta*. 2003; 24(5):479-88.
- Paria BC; Das SK; Dey SK. Embryo implantation requires estrogen-directed uterine preparation and catecholesterogen-mediated embryonic activation. *Adv Pharmacol*. 1998; 42:840-3.

- Parr MB; Parr EL; Tung HN. The permeability of the primary decidual zone in the rat uterus: an ultructural tracer and freezer-fractures study. *Biology of Reproduction*. 1986; 35:1045-1058.
- Prins JR, Hylkema MN, Erwich JJ, Huitema S, Dekkema GJ, Dijkstra FE, Faas MM, Melgert BN. Smoking during pregnancy influences the maternal immune response in mice and humans. *Am J Obstet Gynecol*. 2012 Apr 16.
- Reister F, Frank HG, Kingdom JC, Heyl W, Kaufmann P, Rath W, Huppertz B. Macrophage-induced apoptosis limits endovascular trophoblast invasion in the uterine wall of preeclamptic women. *Lab Invest*. 2001;81(8):1143-52
- Ribatti D, Vacca A, Nico B, Crivellato E, Roncali L, Dammacco F. The role of mast cells in tumour angiogenesis. *Br J Haematol*. 2001;115(3):514-21.
- Ribatti D, Crivellato E. Mast cells, angiogenesis, and tumour growth. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1822(1):2-8.
- Rogers PAW, Murphy CR. Uterine receptivity for implantation: human studies. In: YOSHINAGA, K. *Blastocyst Implantation*. Boston: Adams. 1989; 12:231-238.
- Saito S, Nishikawa K, Morii T, Enomoto M, Narita N, Motoyoshi K, et al. Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *Int Immunol*. 1993; 5,559-63.
- Salamonsen LA, Dimitriadis E, Jones RL, Nie G. Complex regulation of decidualization: a role for cytokines and proteases- a review. *Placenta*. 2003; 24, S76-S86.
- Senner CE, Hemberger M. Regulation of early trophoblast differentiation - lessons from the mouse. *Placenta*. 2010;31(11):944-50.
- Simón C, Valbuena D. Embryonic implantation. *Ann Endocrinol*. 1999; 60:134-136.
- Soares ML, Torres-Padilla ME, Zernicka-Goetz M. Bone morphogenetic protein 4 signaling regulates development of the anterior visceral endoderm in the mouse embryo. *Dev Growth Differ*. 2008;50(7):615-21.
- Srám R; Binková B; Dejmek J; Bobak M. Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature. *Environ Health Perspect*. 2005; 113(4): 375-382.
- Stewart I, Peel S. Stewart The differentiation of the decidua and the distribution of metrial gland cells in the pregnant mouse uterus. *Cell Tissue Res*. 1978; 14;187(1):167-79.
- Szukiewicz D, Szukiewicz A, Maslinska D, Gujski M, Poppe P, Mazurek-Kantor J. Mast cell number, histamine concentration and placenta vascular response to histamine in preeclampsia. *Inflamm Res*. 1999; 48:S39-40.
- Tachi S, Tachi C, Lindner HR. Ultrastructural features of blastocysts attachment and trophoblastic invasion in the rat. *J Reprod Fertil*. 1970; 21:37-56.
- Tacke, F.; Randolph, GF. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subset. *Immunobiology*. 2006; 211:609-618.
- Tarachand U. Metrial gland: structure, origin, differentiation and role in pregnancy. *Biol Res Pregnancy Perinatol*. 1986; 7(1):34-6, 1986.
- Taront S; et al. Implication of scavenger receptors in the interactions between diesel exhaust particles and immature or mature dendritic cells. *Part Fibre Toxicol*. 2009; 13:6-9.

- Torry DS, Leavenworth J, Chang M, Maheshwari V, Groesch K, Ball ER, et al. Angiogenesis in implantation. *J Assist Reprod Genet.* 2007; 24:303-315.
- Tremellen KP, Russell P. The distribution of immune cells and macrophages in the endometrium of women with recurrent reproductive failure. II: adenomyosis and macrophages. *J Reprod Immunol.* 2012;93(1):58-63.
- 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;120(1):150-6.
- Varayoud J, Ramos JG, Bosquiaz VL, Muñoz-de-Toro M, Luque EH. Mast cells degranulation affects angiogenesis in the rat uterine cervix during pregnancy. *Reproduction.* 2004;127(3):379-87.
- Venditti CC, Casselman R, Smith GN. Effects of chronic carbon monoxide exposure on fetal growth and development in mice. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2011; 14:11:101.
- Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldino EG, Ribeiro AA, Mayhew TM, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Biology of reproduction*, 79(3):578-84, 2008.
- Veras, MM; Damaceno-Rodrigues; Silva, RMG; Scoriza, JN; Saldiva, PHN; Caldini, EG; Dolhnikoff, M. Chronic Exposure to Fine Particulate Matter Emitted by Traffic Affects Reproductive and Fetal Outcomes in Mice. *Environ. Res.* 109:536–543, 2009.
- Veras MM, Caldini EG, Dolhnikoff M, Saldiva PH. Air pollution and effects on reproductive-system functions globally with particular emphasis on the Brazilian population. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev.* 2010;13(1):1-15
- 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.
- Zhang J, Chen Z, Smith GN, Croy AB. Natural killer cell triggered vascular transformation: maternal care before birth? *Cell Mol Immunol* 2010, 8,1-11.
- Yılmaz Ö, Küçük M, Kebapçılar L, Altındag T, Yüksel A, Yuvaç HO, Dal T, Savran Y. Macrophage migration-inhibitory factor is elevated in pregnant women with gestational diabetes mellitus. *Gynecol Endocrinol.* 2012;28(1):76-9. Epub 2011 Aug 17.

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 25/03/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0166/09**, intitulado: **"O IMPACTO DA EXPOSIÇÃO PRÉ-GESTACIONAL À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA SOBRE O PROCESSO DE IMPLANTAÇÃO EMBRIONÁRIA"** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Paulo Hilário do Nascimento Saldiva**

Pesquisador (a) Executante: **Júlia Nogueira Scoriza**

CAPPesq, 25 de Março de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa