DANIELA APARECIDA NICOLOSI FOLTRAN JANUÁRIO

Efeitos biológicos e avaliação dose-resposta das partículas de exaustão do diesel sobre o desenvolvimento embrionário inicial de camundongos

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

São Paulo
2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Januário, Daniela Aparecida Nicolosi Foltran
Efeitos biológicos e avaliação dose-resposta das partículas de exaustão do diesel sobre o desenvolvimento embrionário inicial de camundongos / Daniela Aparecida Nicolosi Foltran Januário. -- São Paulo, 2010.
Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.
Orientador: Paulo Hilário Nascimento Saldiva.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Camundongos 3.Fertilização *in vitro* 4.Técnicas de cultura embrionária 5.Blastocisto 6.Apoptose 7.Sobrevivência celular

USP/FM/SBD-094/10

Dedico esta dissertação aos meus pais, *Daniel* e *Mara*, pelo apoio que sempre me deram, pelo incentivo a ir cada vez mais longe e pelo orgulho estampado.

Dedico também aos meus amados irmãos, *Max* e *Otávio*, fontes de amor.

E à minha amada avó, *Schiller*, exemplo de perseverança e sabedoria.

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, por me ensinar a acreditar nas idéias inovadoras e mostrar que a vida acadêmica pode ser prazerosa.

Agradeço à FAPESP.

Ao meu amado marido Fernando, pelo apoio, pela confiança e incentivo. Obrigada por participar ativamente na execução dos projetos, sei que não é fácil um advogado se aventurar no mundo biológico.

Ao Dr. Paulo Marcelo Perin e à Dra. Mariângela Maluf, por acreditarem no meu trabalho e apoiarem minhas idéias. Serei sempre grata pelos imensos ensinamentos, tanto profissionais quanto como ser humano.

Aos meus queridos: Sulleiman, Juliana, Carina e Natália, o que seria da vida sem vocês?

Aos meus pequenos, fontes de alegria, bênçãos divinas, renovações da vida: Bruno, Victor Hugo e Victória.

À minha segunda família: meus sogros, José Roberto e Fátima e cunhados: Igor e Cláudia.

A Dra. Ana Júlia Lichtenfels, por ser não apenas uma ótima acadêmica e colega de experimentos, mas por ter se tornado uma grande amiga.

A todos os colegas que compartilharam comigo as ansiedades, tristezas e alegrias no decorrer desses anos: Márcia Hage, Juliana Andrietta, Emília, Mariângela

Macchione, Regiane, Josê Mára, Heloísa, Dolores, Luís Alberto, Dr. Chin Jia Lin, entre outros.

A todos os funcionários do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, que direta ou indiretamente estiveram presentes na realização deste projeto.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas e Prof. Dr. José Xavier Neto que sempre me ajudaram todas as vezes que os procurei, sempre estiveram dispostos a solucionar alguns de meus problemas.

A todos que acreditaram em mim e se importaram com o andamento do projeto, e que de alguma forma compartilharam meus anseios e ajudaram-me a perseverar....

...Muito Obrigada!

"Nós, cientistas, acreditamos que o que nós e nossos semelhantes fizermos ou deixarmos de fazer nos próximos anos determinará o destino de nossa civilização. E consideramos nossa tarefa explicar incansavelmente essa verdade, ajudar as pessoas a perceber tudo o que está em jogo, e trabalhar, não para contemporizar, mas para aumentar o entendimento e conseguir, finalmente, a harmonia entre os povos e nações de diferentes pontos de vista."

Albert Einstein

Sumário

Sumário

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Abreviaturas

Lista de Siglas

Lista de Símbolos

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO 2

1.1. Poluição do Ar na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP) 2

1.2. Material Particulado 4

1.2.1. Partículas de Exaustão do Diesel 6

1.3. Poluição Atmosférica e Saúde 8

1.3.1. Poluição Atmosférica e Toxicologia Reprodutiva 9

1.3.1.1. Evidências Experimentais 13

1.4. Estudos do Impacto da Poluição Atmosférica sobre a Saúde 16

1.4.1. Estudos Epidemiológicos 16

1.4.2. Estudos Experimentais 17

1.5. Biologia da Reprodução 21

1.5.1. Desenvolvimento Embrionário 21

1.5.2. Diferenciação da Massa Celular Interna e Trofectoderma 22

1.5.3. Implantação Embrionária 26

1.6. Possíveis mecanismos de ação da poluição atmosférica sobre a fertilidade . 27

2. OBJETIVOS 33

2.1. Objetivos Específicos 33

3. MÉTODOS 36

3.1. Animais 36

3.2. Partículas de Exaustão do Diesel: coleta, caracterização e preparo. 37

3.3. Meios de Cultivo e Fertilização in vitro 38

3.4. Delineamento Experimental 39
3.5. Avaliação Embrionária 41
3.6. Contagem Diferencial das Células da Massa Celular Interna e do Trofectoderma e Morfologia da Massa Celular Interna 43
3.7. Teste de Adesão do Blastocisto e Crescimento do Trofectoderma 45
3.8. Detecção de Apoptose e Morte Celular 47
3.9. Contagem das células Oct4 *e* CDX2 49
3.10. Análise Estatística 50
4. Resultados 53
4.1. Caracterização das Partículas Exauridas do Diesel 53
4.2. Experimento 1 53
Efeitos no desenvolvimento embrionário *in vitro* e na segregação celular 53
4.3. Experimento 2 58
Efeitos sobre o desenvolvimento peri-implantacional 58
Efeitos sobre a viabilidade e apoptose celular 59
Efeitos sobre expressão de Cdx2 e Oct4 nos blastocisto 120 hpi 61
5. DISCUSSÃO 64
6. CONCLUSÕES 75
REFERÊNCIAS 77

Listas

Lista de Tabelas

Tabela 1: Efeitos do cultivo *in vitro* de zigotos por 120 hpi em diferentes concentrações de partículas exauridas do diesel (PED) sobre o desenvolvimento embrionário e a segregação celular dos blastocistos 54

Tabela 2: Análise em modelo linear geral multivariado: efeito individual das variáveis independentes – Desenvolvimento Embrionário e Segregação Celular..... 55

Tabela 3: Comparação dos efeitos das diferentes concentrações de partículas exauridas do diesel (PED) presentes no meio de cultivo *in vitro* sobre o desenvolvimento embrionário e a segregação celular no estágio de blastocisto 120 hpi 56

Tabela 4: Comparação dos efeitos das diferentes concentrações de partículas exauridas do diesel (PED) presentes no meio de cultivo *in vitro* sobre a viabilidade celular no estágio de blastocisto 120 hpi 60

Lista de Figuras

Figura 1: Fotografia ilustrativa de um oócito de camundongo normalmente fertilizado. Note a presença de dois corpúsculos polares (às 9h o 1º corpúsculo polar degenerado) e dois pró-núcleos. 41

Figura 2: Diferentes estágios de eclosão do blastocisto (96 e 120 hpi): a) graduação 0 = ausência de eclosão; b) graduação 1 = inicial (herniação através da ZP menor que 50% do embrião); c) graduação2 = parcial (herniação através da ZP pelo menos 50% do embrião) e; d) graduação 3 = blastocisto totalmente eclodido. 43

Figura 3: Fotografias de embriões corados pela técnica da coloração diferencial. Células do trofectoderma (TE) na cor rosa, enquanto células da massa celular interna (MCI) em azul. Cada embrião apresenta uma classificação da integridade morfológica da MCI: a) Escore MCI 1 = núcleos da MCI densamente compactados em uma região restrita do blastocisto; b) Escore MCI 2 = núcleos da MCI frouxamente compactados em uma região restrita do blastocisto e; c) Escore MCI 3 = núcleos da MCI espelhados pelo blastocisto. 44

Figura 4: Fotografias ilustrativas da graduação da morfologia da massa celular interna (Escore MCIo) dos embriões aderidos à matriz extracelular de fibronectina. Em a) Escore MCIo = 1, formada muitas células densamente agrupadas; b) Escore MCIo = 2, muitas células agrupadas de frouxamente; c) Escore MCIo = 3, constituída por poucas células e; d) ausência de MCI, Escore MCIo = 4. 46

Figura 5: Imagens ilustrativas de um embrião (120 hpi) corado para a detecção de morte e apoptose celular. Em a) fotomicrografia do embrião visualizado no filtro DAPI; b) este embrião no mesmo plano focal visto através do filtro específico para o iodeto de propídeo (vermelho) e o FITC (verde) e; em c) a sobreposição das duas imagens anteriores. Após a sobreposição das imagens, os núcleos visualizados em verde representam as células em apoptose, os núcleos das células mortas são visualizados em rosa, enquanto as células viáveis, foram marcadas com a contra-coloração azul. 48

Figura 6: Diagrama de caixas retratando a distribuição de: a) número total de células; b) número de células na MCI; c) número de células no TE e; d) razão MCI/TE em blastocistos (120 hpi) originados de zigotos

cultivados em KSOMaa contendo nas diferentes concentrações de PED..... 57

Figura 7: Fotomicrografias de contraste de modulação Hoffman da adesão do blastocisto no dia 6 (a; d; e g) e crescimento na matriz de fibronectina nos dias 7 (b; e; e h) e 8 (c; f e i). Blastocistos derivados de zigotos de camundongo expostos às distintas concentrações de PED ao longo do desenvolvimento inicial: 0 µg/cm² (a; b; e c); 0,2 µg/cm² (d; e; e f); 2 µg/cm² (g; h; e i). As setas indicam a massa celular interna (MCI) no dia 8 de desenvolvimento. 59

Figura 8: Expressão de *Oct4* (vermelho) e *Cdx2* (verde) em blastocistos 120 hpi de derivados de zigostos expostos a distintas concentrações de PED ao longo do desenvolvimento inicial: (a) 0 µg/cm²; (b) 0,2 µg/cm²; e (C) 2 µg/cm². As porcentagens de *Oct4* e *Cdx2* assim com a razão entre elas são mostradas em (d) e (e), respectivamente, de acordo com a concentração de PED. IC: interval de confiança. 62

Lista de Abreviaturas

AhR	receptor de hidrocarboneto aromático
ATP	adenosina trifosfato
Bax	proteína X associada ao *Bcl2*
BSA	soro albumina bovina
Cdx2	gene Caudal-type homeobox 2
Cdx2 $^{-/-}$	homozigoto para mutação nula do gene Caudal-type homeobox 2
CIUR	Crescimento intra-uterino retardado
COC	complexo cúmulus-oócito
COV	compostos orgânicos voláteis
D	dia
DAPI	4,6'-diamidino-2-phenilindole
DGP	diagnóstico genético pré-implantacional
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNAse	enzima desoxirribonuclease
DNMT	DNA metiltransferases
DP	desvio padrão
eCG	gonadotrofina coriônica eqüina
ED	exaustão do diesel
EDTA	ácido etileno-di-amino-tetra-acético
ERO	espécies reativas de oxigênio
et al.	e outros
FBS	soro fetal bovino

FITC	isotiocianato de fluoresceína
FIV	fertilização *in vitro*
FSH	hormônio folículo estimulante
HC	hidrocarbonetos
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HEPA-VOC	sistema de filtração ultra-eficiente de partículas e para compostos orgânicos voláteis
HO-1	proteína heme-oxigenase 1
HPA	hidrocarboneto(s) policíclico(s) aromático(s)
hpi	horas pós-inseminação
HSA	albumina sérica humana
HSD	diferença honestamente significante
HTF	fluído tubário humano
IC	intervalo de confiança
IP	intra-peritoneal
ISO 5	ambiente com concentração menor ou igual a 100 partículas de tamanho < 0,5 µm por pé cúbico
KSOMaa	meio simples otimizado enriquecido com potássio e suplementado com aminoácidos
LH	hormônio luteinizante
MANOVA	análise de multivariância
MCI	massa celular interna
MEC	matriz extracelular
mHTF	fluído tubário humano modificado
MP	material particulado
MP_{10}	material particulado com diâmetro aerodinâmico < 10µm

$MP_{2,5}$	material particulado com diâmetro aerodinâmico < 2,5µm
Nitro-HPA	hidrocarbonetos policíclicos nitro-aromáticos
NO_x	óxidos de nitrogênio
Oct4	octamer-4
PBS	solução salina tamponada
PBS/PVP	solução salina tamponada suplementada com 1 mg/mL de PVP
PED	partículas de exaustão do diesel
Per-Arnt-Sim	família de proteínas contendo o domínio *basic helix-loop-helix*
PI	iodeto de propídeo
PTS	partículas totais em suspensão
PVP	polivinil-pirrolidona
RNA	ácido ribonucléico
RNAse	enzima ribonuclease
SB	solução de bloqueio
SO_x	óxidos de enxofre
SSS	soro substituto sintético
TE	trofectoderma
TUNEL	marcador do entalhe do terminal dUTP
TX-100	Triton X-100
UI	unidade internacional
ZP	zona pelúcida

Lista de Siglas

CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
EUA	Estados Unidos da América
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da FMUSP
LPAE	Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental
NIH	National Institutes of Health
OMS	Organização Mundial da Saúde
RMSP	Região Metropolitana de São Paulo
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

Lista de Símbolos

%	porcentagem
<	menor que
=	igual a
>	maior que
±	mais ou menos
≈	aproximadamente igual a
≤	menor ou igual que
°C	graus Celsius
µg	microgramas
µg/cm^2	micrograma por centímetro quadrado
µg/m^3	micrograma por metro cúbico
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
µm^2	micrometro quadrado
CO	monóxido de carbono
CO_2	dióxido de carbono
EU/mL	unidade de endotoxina por mililitro
F	distribuição da taxa de variância
g	gramas
h	hora
hp	cavalos-vapor
mg/mL	miligrama por mililitro

mL	mililitro
mm	milímetro
mOsm	miliosmole
n	número
N_2	nitrogênio
nm	nanômetro
NO_2	dióxido de nitrogênio
O_3	ozônio
P	probabilidade
pH	potencial de hidrogênio
ppm	parte por milhão
SO_2	dióxido de enxofre
t/ano	toneladas ao ano

Resumo

RESUMO

Januário, DANF. *Efeitos biológicos e avaliação dose-resposta das partículas de exaustão do diesel sobre o desenvolvimento embrionário inicial de camundongos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 86p.

Experimentos anteriores realizados em nosso laboratório indicam que o sucesso gestacional é afetado pela poluição atmosférica. O presente estudo teve como objetivo avaliar os efeitos biológicos associados a uma curva dose resposta das partículas de exaustão do diesel (PED) sobre o desenvolvimento embrionário inicial e o potencial de implantação, utilizando-se como modelo a fertilização *in vitro* e o cultivo embrionário de camundongos. No Experimento 1, encontrou-se um efeito negativo dose-dependente sobre o desenvolvimento embrionário inicial, o processo de eclosão, a alocação das células e a morfologia da massa celular interna (MCI) dos blastocistos. A análise *post-hoc* revelou que o desenvolvimento precoce do embrião não foi afetado pelas concentrações de 0,2 $\mu g/cm^2$ ou 2 $\mu g/cm^2$, mas foi significativamente afetado pela concentração de 20 $\mu g/cm^2$ de PED. O processo de eclosão foi prejudicado pelas concentrações de 2 $\mu g/cm^2$ e 20 $\mu g/cm^2$. A alocação das células da MCI e a relação entre as células da MCI e do trofectoderma foram significativamente afetadas por todas as concentrações. Adicionalmente, observou-se um efeito negativo sobre a morfologia da MCI para as concentrações de 2 $\mu g/cm^2$ e 20 $\mu g/cm^2$. O Experimento 2, apesar de não mostrar efeito significativo sobre o potencial de implantação, evidenciado pela capacidade de adesão dos blastocistos e crescimento trofoblástico, revelou que a morfologia da MCI no dia 8 de cultivo, as taxas de viabilidade e de apoptose celular e a expressão de *Oct4* e *Cdx2* foram significativamente afetadas. O teste HSD-Tukey demonstrou que a presença de PED (0,2 $\mu g/cm^2$ e 2 $\mu g/cm^2$) durante o desenvolvimento embrionário aumentou significativamente a taxa de células em apoptose dos embriões tanto no dia 5 quanto no dia 8 de cultivo e, embora a proporção de células viáveis no dia 8 tenha sido prejudicada por ambas as concentrações, apenas a exposição a 2 $\mu g/cm^2$ de PED diminuiu a viabilidade celular no dia 5. Por outro lado, tanto a concentração de 0,2 $\mu g/cm^2$ como a de 2 $\mu g/cm^2$ tiveram um efeito negativo significativo sobre a qualidade da MCI no dia 8 e a taxa de expressão de *Oct4* nos blastocistos e aumentaram a porcentagem de células desses blastocistos expressando *Cdx2*, adicionalmente, a razão *Oct4/Cdx2* dos embriões expostos a 0,2 $\mu g/cm^2$ e 2 $\mu g/cm^2$ foi significativamente menor. Frente a esses resultados, presumi-se que as PED poderiam estar envolvidas nos mecanismos que

levariam à diminuição do sucesso reprodutivo observado em camundongos expostos à poluição atmosférica ambiental.

Descritores: poluição do ar, camundongos, fertilização *in vitro*, técnicas de cultura embrionária, blastocisto, apoptose, sobrevivência celular

Summary

SUMMARY

Januário, DANF. *Biological effects and dose-response assessment of diesel exhaust particles on in vitro early embryo development in mice* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 86p.

Previous experiments conducted in our laboratory demonstrate that successful pregnancy is affected by air pollution. The aim of this study was to evaluate the biological effects associated with a dose-response curve of the diesel exhaust particles (DEP) on early embryonic development and implantation potential, using mice *in vitro* fertilization and culture embryo as model. In Experiment 1, we found a negative dose-dependent effect on the embryonic development, hatching process, cell allocation and morphology of inner cell mass (ICM) of blastocysts. A *post-hoc* analysis revealed that the early development of the embryo was not affected by concentrations of 0.2 $\mu g/cm^2$ or $2\mu g/cm^2$, but was significantly affected by the concentration of 20 $\mu g/cm^2$ of DEP. The hatching process was impaired by concentrations of 2 $\mu g/cm^2$ and 20 $\mu g/cm^2$. Cell allocation of ICM and the ratio between cells of ICM and trophectoderm were significantly affected by all concentrations. Addicionaly, we observed a negative effect on ICM morphology was observed for the 2 $\mu g/cm^2$ and the 20 $\mu g/cm^2$ concentrations. Experiment 2, despite showing no significant effect on implantation potential, as evidenced by the adhesion ability and trophoblast outgrowth, revealed that ICM morphology on day 8 of culture, rates of cell viability and apoptosis, and expression of *Oct4* and *Cdx2* were significantly affected. The Tukey HSD test showed that presence of DEP (0.2 $\mu g/cm^2$ and 2 $\mu g/cm^2$) during embryonic development increased significantly the rate of apoptotic cells in embryos as on day 5 as on day 8 of culture, although the proportion of viable cells on day 8 was impaired by both concentrations, only exposure to 2 $\mu g/cm^2$ PED decreased cell viability on day 5. On the other hand, both the concentration of 0.2 $\mu g/cm^2$ such as 2 $\mu g/cm^2$ had a significant negative effect on the quality of ICM on the day 8 and the rate of expression of *Oct4* on blastocysts, and increased the percentage of cells from these embryos expressing *Cdx2*, also, *Oct4/Cdx2* ratio were significantly lower in the blastocysts derived from embryos exposed to 0.2 $\mu g/cm^2$ and 2 $\mu g/cm^2$ concentrations. Given these results, the suggestion is that DEP could be involved in the mechanisms that lead to decreased reproductive success observed in mice exposed to environmental pollution.

Descriptors: air pollution, mice, *in vitro* fertilization, embryo culture techniques, blastocyst, apoptosis, cell survivor

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a infertilidade afete cerca de 80 milhões de pessoas ao redor do mundo. Em geral, cerca de 10% a 15% dos casais apresentam infertilidade primária ou secundária, mas sua incidência varia de menos de 5% a mais de 30% entre os diferentes países. Embora a infertilidade possa ser causada por inúmeros fatores e com incidências variáveis em populações distintas, a produção anormal de gametas (oócitos e/ou espermatozóides), os defeitos tubários ou a ocorrência de endometriose pélvica representam as suas causas mais freqüentes. Contudo, é importante ressaltar que uma proporção significativa dos casos de infertilidade não apresenta uma causa aparente. Inúmeros estudos têm sugerido que a exposição a agentes ambientais têm o potencial de alterar os tecidos reprodutivos masculinos e femininos e, portanto, afetar a capacidade reprodutiva da população[1].

1.1. Poluição do Ar na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP)

Conforme a Resolução CONAMA nº 3 de 28/06/1990[2], considera-se poluente atmosférico *"qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar: impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde;*

inconveniente ao bem-estar público; danoso aos materiais, à fauna e à flora; prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade".

No Estado de São Paulo, desde 1972, a CETESB monitora e divulga diariamente os dados de qualidade do ar gerados pela sua rede de monitoramento. Os poluentes universalmente utilizados como indicadores da qualidade do ar são: monóxido de carbono (CO), dióxido de enxofre (SO_2), material particulado (MP), ozônio (O_3) e óxidos de nitrogênio (NO_x). A razão da escolha desses parâmetros como indicadores de qualidade do ar está ligada à maior freqüência de ocorrência e aos efeitos adversos que causam ao meio ambiente[(3)].

A RMSP possui cerca de 2000 indústrias de alto potencial poluidor e a frota registrada, até dezembro de 2008, de aproximadamente 9,2 milhões de veículos, composta por 7,4 milhões de veículos do ciclo Otto[a], 490 mil veículos a diesel e 1,2 milhões de motos. De acordo com as estimativas de 2008, essas fontes de poluição são responsáveis pelas emissões para a atmosfera dos seguintes poluentes: 1,56 milhões de t/ano de CO, 387 mil t/ano de hidrocarbonetos (HC), 367 mil t/ano de NO_x, 62,3 mil t/ano de material particulado total e 25,5 mil t/ano de óxidos de enxofre (SO_x). Desses totais, os veículos são responsáveis por 98% das emissões de CO, 97% de HC, 96% de NO_X, 40% de MP e 33% de SO_X[(3)].

---

[a] Automóveis que usam combustíveis leves como gasolina, álcool e gás natural.

Embora a diversidade de poluentes encontrada na atmosfera seja grande e esteja correlacionada com as fontes de emissão característica da região, é importante destacar que, mesmo mantidas as emissões, a qualidade do ar pode mudar em função das condições meteorológicas que determinam uma maior ou menor diluição dos poluentes. É por isso que a qualidade do ar piora com relação aos parâmetros CO, MP e SO_2, durante os meses de inverno, quando as condições meteorológicas são mais desfavoráveis à dispersão dos poluentes. Já o O_3 apresenta maiores concentrações na primavera e verão, por ser um poluente secundário que depende da intensidade de luz solar para ser formado[3].

1.2. Material Particulado

Material Particulado engloba um conjunto de poluentes constituídos de poeiras, fumaças e todo tipo de material sólido e líquido que se mantém suspenso na atmosfera por causa de seu pequeno tamanho, embora variem em dimensão, composição e origem. As principais fontes de emissão de MP para a atmosfera são: veículos automotores, processos industriais, queima de biomassa, ressuspensão de poeira do solo, entre outros. O MP pode também se formar na atmosfera a partir de gases como SO_2, NO_x e compostos orgânicos voláteis (COV), que são emitidos principalmente em atividades de combustão como resultado de reações químicas no ar[3].

O material particulado pode ser classificado como:

- Partículas Totais em Suspensão (PTS): abrange as partículas que apresentam diâmetro aerodinâmico menor que 50 µm. Uma parte destas é inalável e/ou respirável capaz de causar problemas à saúde, outra parte pode afetar desfavoravelmente a qualidade de vida da população, interferindo nas condições estéticas do ambiente e prejudicando as atividades normais da comunidade;
- Partículas Inaláveis (MP_{10}): apresentam diâmetro aerodinâmico menor que 10 µm. As partículas inaláveis grossas (entre 2,5 µm e 10 µm) resultam de processos mecânicos, operações de moagem e ressuspensão de poeira;
- Partículas Respiráveis ou Partículas Inaláveis Finas ($MP_{2,5}$): com diâmetro aerodinâmico menor que 2,5 µm, são as partículas que penetram mais profundamente no trato respiratório; as menores que 0,5 µm podem se depositar nos alvéolos pulmonares, enquanto as maiores ficam retidas na parte superior do sistema respiratório. Geralmente são emitidas em processos de combustão e exaustão de veículos automotores, mas também se formam na atmosfera a partir de reações químicas de gases como SO_2, NO_X e COV emitidos, principalmente, em atividades de queima de combustível.

As partículas ultrafinas (< 0.1 µm) têm um tempo de residência relativamente pequeno na atmosfera, pois se agregam para formar partículas maiores[4].

As diferentes faixas de diâmetro do material particulado inalável traduzem diferenças em composição química e origem das partículas[4].

Diversos estudos realizados na RMSP desde 1987 mostram que a fração fina ($MP_{2,5}$) predomina o MP_{10}, correspondendo a cerca de 60% desse material, além disso observa-se significativa contribuição da emissão veicular na fração fina (37 %)[3].

O tamanho das partículas está indiretamente associado ao potencial causador de problemas à saúde, isto é, quanto menores em tamanho, maiores os danos provocados.

1.2.1. Partículas de Exaustão do Diesel

A formação de MP no escapamento do veículo é fortemente dependente da queima de combustível e do óleo lubrificante, e do desgaste de rolamentos e materiais dos motores[5]. Entretanto, a emissão veicular de MP deve-se principalmente aos motores movidos a diesel, sendo muito pequena a contribuição dos motores do ciclo Otto.

Segundo a CETESB[3], a contribuição automotiva para a emissão de MP é de 40%, disso 71,2% deve à emissão do tubo de escapamento dos motores a diesel. Assim sendo, as partículas de exaustão do diesel (PED) representaram 28,46% da contribuição relativa das fontes de MP_{10} na RMSP em 2008.

A exaustão do diesel (ED) representa uma mistura complexa de centenas de compostos orgânicos e inorgânicos que estão presentes em tanto na fase gasosa quanto particulada.

Os principais componentes da fase gasosa são CO, CO_2, NO_x, SO_x, O_3, nitrogênio (N_2), vapor de água e HC de baixo peso molecular.

A fase particulada, PED, é composta por um núcleo de carbono sobre o qual milhares de compostos orgânicos e metais pesados são adsorvidos. Entretanto, os compostos orgânicos adsorvidos consistem em uma grande variedade de compostos que inclui combustível não queimado, óleo de motor, compostos gerados pelo processo de combustão e pirólise de combustível e produtos de reações secundárias. Segundo Braun *et al*.[6] a composição elementar das PED pode variar dependendo da qualidade do diesel, do desempenho do motor e do modo de operação, entretanto, apresenta como composição básica: 70% em massa de carbono, 20% de oxigênio, 3% de enxofre, 1,5% de hidrogênio, menos que 1% de nitrogênio e, aproximadamente, 1% de elementos traços.

A fração orgânica das PED inclui numerosos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), nitro-HPA, hidrocarbonetos heterocíclicos, quinonas, aldeídos e hidrocarbonetos alifáticos[7-9], os quais apresentam grandes implicações ambientais. Além disso, a fração orgânica, em contato com as superfícies respiratórias, pode ser distribuída sistemicamente e atingir os demais sistemas orgânicos, assim como suas partículas ultrafinas.

A toxicidade das PED pode ser atribuída à própria partícula, aos componentes adsorvidos em sua superfície, ou a ambos, e representa uma importante fonte de preocupação devido ao seu caráter universal de distribuição nas grandes cidades[10].

Essas partículas, correlacionadas às propriedades químicas dos compostos adsorvidos, podem causar disfunção vascular[11], dano ao DNA[12], oxidação protéica[13] e induzir proliferação celular[14], estresse oxidativo[15] e apoptose[16].

Apesar do conhecimento de que muitos dos compostos presentes nas PED estão correlacionados à toxicidade e a prejuízos à saúde humana e ambiental, a relação entre estes compostos e seus efeitos biológicos ainda não são bem compreendidos.

1.3. Poluição Atmosférica e Saúde

Os primeiros dados associando os efeitos negativos da poluição ambiental sobre a saúde surgiam entre as décadas de 30 e 50 do século XX, tendo como fonte o repentino aumento das taxas de mortalidade observado durante elevações extremas dos níveis de poluição urbana (Vale de Meuse, Bélgica, 1930; cidade de Donora, Pensilvânia, EUA, 1948; Londres, Inglaterra, 1952)[17].

Recentemente, vários estudos têm demonstrado que o nível de poluição atmosférica presente nos centros urbano-industriais representa um fator de risco para a saúde humana, em particular, para doenças respiratórias e cardiovasculares[18-20]. Observa-se também um aumento na freqüência de atendimentos hospitalares e na taxa de mortalidade em populações residentes de centros urbanos[21]. Adicionalmente, a exposição repetida, de longa duração, aumenta o risco cumulativo de doenças

pulmonares e cardiovasculares crônicas, processos alérgicos, doenças infecciosas, doenças endócrinas e a incidência de neoplasias[20, 22-25].

Outro aspecto relevante dos efeitos da poluição atmosférica sobre a saúde está ligado ao padrão de exposição da população. A exposição aguda ao MP pode exacerbar doenças pré-existentes, aumentando a sintomatologia, a necessidade de atendimento médico e o risco de morte. Por outro lado, a exposição crônica aumenta os riscos cumulativos associados às doenças pré-existentes e de óbito[20]. Essas observações têm implicações clínicas importantes na identificação de subgrupos populacionais de risco ou susceptibilidade aumentados a esses efeitos. Saldiva *et al.*[26] demonstraram que esses efeitos eram exacerbados na população idosa quando comparada à adulta em geral. Estudos avaliando os efeitos da exposição à poluição na infância demonstram que esse grupo etário também é mais vulnerável do que a população geral[19, 27]. Evidências recentes apontam as gestantes como um novo grupo de risco, demonstrando que a poluição atmosférica está associada a complicações fetais na gestação e no nascimento[28-30].

1.3.1. Poluição Atmosférica e Toxicologia Reprodutiva

Além dos efeitos deletérios acima mencionados, a exposição à poluição de grandes centros urbanos tem sido, nos últimos anos, considerada uma importante causa de risco para a saúde reprodutiva, interferindo na fertilidade e no desenvolvimento fetal,

caracterizado por alterações significativas na mortalidade intra-uterina, fetal e neonatal, bem como no peso fetal[31].

Ademais, várias evidências de estudos focados na fertilidade masculina demonstraram uma queda na qualidade espermática associada à exposição a fatores ambientais, particularmente à piora dos índices de qualidade do ar[32, 33]. Estudos posteriores, apesar de não identificarem uma relação entre a poluição ambiental e parâmetros de produção espermática, mostraram uma associação significativa entre poluição do ar nos meses de inverno e certos indicadores de qualidade, entre eles morfologia, a aneuploidia cromossômica e a estrutura da cromatina dos espermatozóides[34, 35]. Rubes *et al.*[36] confirmaram a observação de que a exposição intermitente a níveis relativamente elevados de poluentes não afeta a concentração espermática, mas aumenta significativamente a porcentagem de espermatozóides com fragmentação de DNA, indicando um dano na integridade da cromatina espermática. Esse fato tem implicações clínicas importantes para a fertilidade no aspecto populacional, uma vez que altas taxas de fragmentação do DNA (>30%) estão associadas à infertilidade e ao aumento do risco de abortamento espontâneo[37, 38].

Outros estudos relacionam a exposição materna a interferências no sucesso reprodutivo. A exposição à poluição atmosférica durante o período gestacional tem um papel relevante sobre a morbidade e/ou mortalidade pré e pós-natal. Bobak e Leon[39] avaliando a população da República Tcheca demonstraram uma associação significativa entre MP total e SO_2 e mortalidade neo e pós-natal. Estudos conduzidos na China, República Tcheca e Estados Unidos demonstraram uma associação positiva

entre poluição atmosférica e baixo peso fetal ao nascer[40-42]. Dejmek *et al.*[43] avaliaram o impacto do MP_{10} e $MP_{2,5}$ sobre o desenvolvimento fetal e demonstraram um aumento das taxas de retardo de crescimento intra-uterino (CIUR) quando a concentração de MP_{10} durante o primeiro mês de gestação encontrava-se acima de 40 $\mu g/m^3$. Posteriormente, Dejmek *et. al.*[44] concluíram que a associação entre a concentração de MP_{10} e o CIUR, poderia ser explicada, em parte, pela interferência da fração carcinogênica dos HPA aderida ao MP sobre alguns processos do desenvolvimento ou mesmo sobre a nutrição fetal. O CIUR representa um dos parâmetros mais comuns resultantes da exposição durante o período gestacional, constituindo-se em um importante fator preditivo da morbi-mortalidade neonatal.

Estudos desenvolvidos em nosso laboratório também têm demonstrado impactos da poluição atmosférica sobre os desfechos reprodutivos na população da cidade de São Paulo. Associações significativas entre variações agudas da poluição do ar e mortalidade fetal tardia, bem como evidências de aumentos de carboxihemoglobina em paralelo às variações ambientais de CO foram demonstradas[29].

Lin *et al.*[45] avaliando o impacto da poluição sobre a mortalidade fetal, estimaram um aumento de 3,5 e 4% na mortalidade quando associado ao O_3 e NO_2, respectivamente. Associações significativas entre as ocorrências de mortalidade neonatal e concentrações de MP_{10}, SO_2 e NO_2 também foram demonstradas, sendo que o aumento estimado para este evento foi de 10%.

Outro estudo pretendeu demonstrar a suscetibilidade dos fetos à poluição de acordo com o trimestre gestacional. Após controlar o efeito de variáveis como sexo da criança, idade materna, nível educacional, assistência pré-natal, tipo de parto, mês do nascimento e padrões de sazonalidade, observaram que o aumento de 1 ppm de CO e 10 $\mu g/m^3$ de MP_{10} na atmosfera foi associado à redução do peso fetal em aproximadamente 23,0 e 13,7 g, respectivamente. Observou-se também que o primeiro trimestre de gestação foi o mais vulnerável a esses efeitos[46].

Perin *et al.*[47] realizaram o primeiro estudo para avaliar os possíveis efeitos da exposição pré-concepcional de curta duração ao MP_{10} ambiente sobre o desfecho da gravidez de mulheres que vivem em uma grande área metropolitana. Os resultados fornecem evidências de associação entre uma breve exposição a altos níveis de MP_{10} ambiente durante o período pré-concepcional e perda gestacional precoce, independentemente do método de concepção, natural ou através de fertilização *in vitro*.

Embora os estudos epidemiológicos sejam os mais utilizados para a avaliação dos riscos sobre o sistema reprodutivo humano, a identificação dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas alterações do desenvolvimento inicial e implantação embrionária humana torna-se extremamente difícil, devido principalmente às dificuldades inerentes a este tipo de abordagem como a obtenção de pacientes com o mesmo perfil de exposição, a idade, o fator de infertilidade, o protocolo de indução da ovulação bem como, a obtenção e utilização de embriões.

1.3.1.1. Evidências Experimentais

Uma vez que diferentes variáveis de confusão podem estar associadas à redução da fertilidade, dificultando, portanto, o estabelecimento de uma relação causa-efeito entre poluição atmosférica e o desfecho reprodutivo, estudos experimentais têm demonstrado evidências significativas dos efeitos de poluentes.

Com a utilização das câmaras de topo aberto, o Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LPAE-FMUSP) realizou vários estudos que demonstraram os efeitos negativos sobre parâmetros reprodutivos. Mohallem *et al.*[48] demonstraram uma queda da fertilidade em camundongos expostos, o aumento na ocorrência de falhas de implantação foi positivamente correlacionado com a exposição ao MP_{10} e NO_2 atmosférico. Verificou-se também uma diminuição na razão machos/fêmeas nascidos nas câmaras que recebiam ar ambiente[49]. Camundongos expostos à poluição demonstraram uma maior susceptibilidade em relação ao peso fetal e a freqüência de aborto, sendo estes efeitos evidenciados durante a primeira semana gestacional. Uma diminuição do peso placentário também foi observada quando os animais foram expostos por todo período gestacional[50]. Adicionalmente, Veras *et al.*[51] demonstraram que a exposição à poluição atmosférica real da cidade de São Paulo produz alterações placentárias morfofuncionais na porção materna da interface entre mãe e feto, embora haja uma melhora no transporte por difusão passiva do lado fetal, comprometendo o

desenvolvimento. Em estudo posterior, Veras *et al.*[52] reforçaram a idéia de que a exposição a níveis urbanos de MP derivado do tráfego tem um impacto negativo em diferentes funções e etapas do processo reprodutivo, devido ao declínio do número de folículos pré-antrais, aumento do tempo necessário para acasalamento e diminuição dos índices gestacionais e de fertilidade, além do aumento de perdas pós-implantação e diminuição do peso fetal em camundongos expostos ao MP.

Outro trabalho do grupo demonstrou os efeitos sobre o desenvolvimento embrionário inicial e sobre a alocação celular de blastocistos. Verificou-se que poluição atmosférica não altera o padrão de desenvolvimento embrionário *in vitro*, porém a relação entre o número de células da massa celular interna (MCI) e o número de células do trofectoderma (TE) dos embriões provenientes de fêmeas expostas mostrou-se alterada devido a uma diminuição das células da MCI e um aumento da TE, entretanto, sem alteração no número total de células (MCI + TE)[53].

1.3.1.2. Partículas de Exaustão do Diesel e Toxicologia Reprodutiva

Os efeitos da exposição à exaustão do diesel ou às partículas exauridas dessa combustão sobre o sistema reprodutivo masculino incluem um aumento da concentração plasmática de testosterona, supressão da espermatogênese, evidenciada pela redução do número de espermátides alongadas nos túbulos seminíferos e da produção diária de espermatozóides, além de uma maior incidência de espermatozóides com morfologia alterada[54, 55].

Evidências sugerem que a exposição materna às PED correlaciona-se com um aumento significativo da incidência de resultados adversos na gestação, incluindo perdas fetais iniciais e desenvolvimento peri-natal inadequado[56]. Demonstrou-se, também, a ocorrência da exposição transplacentária associada ao aumento significativo da freqüência de deleções no DNA de fetos[57], alterações da expressão de genes ligados aos sistemas endócrino e imunológico no início e no final da gestação[58] e a atividade estrogênica dos nitro-fenóis presentes nas PED[59]. Adicionalmente, esse tipo de exposição foi associado a alterações da prole, incluindo redução do peso ao nascer, diminuição da distância ano-genital em ambos os sexos, desvios na diferenciação testicular e ovariana e alteração do ganho de peso no período de lactação, além de uma abertura vaginal precoce nas fêmeas[56, 60-62].

Perin *et al.*[63] utilizaram-se da instilação nasal, para administrar 50 µg de PED completa e a fração da extração ácida da PED, por três dias, durante o hiper-estímulo ovariano de fêmeas de camundongos e, em seguida, realizaram a fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo embrionário. Os resultados não demonstraram nenhuma alteração sobre a resposta ovariana ao hiper-estímulo, assim como sobre as taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário. Entretanto, observou-se uma alteração na razão MCI/TE dos blastocistos obtidos, evidenciando um efeito negativo sobre a primeira segregação das linhagens celulares no estágio de blastocisto.

1.4. Estudos do Impacto da Poluição Atmosférica sobre a Saúde

A partir das evidências de que a poluição atmosférica afeta a saúde das populações expostas, a comunidade científica passou a analisar os eventos relacionados e desenvolver estudos para compreender a fisiopatologia e os mecanismos envolvidos, lançando mão de pesquisas epidemiológicas e ensaios toxicológicos para identificar e caracterizar a ação dos diversos agentes poluidores, e tentar estabelecer com clareza a relação causa-efeito principalmente sobre a saúde humana.

1.4.1. Estudos Epidemiológicos

Os estudos epidemiológicos desempenham um importante papel na compreensão da relação causa-efeito da poluição atmosférica sobre a saúde humana. Esse tipo de estudo analisa uma amostra da população em conjunto com a exposição ambiental e outros fatores que influenciam essa relação, de modo a permitir inferir uma relação causal entre ambos[64, 65].

Considerando que fatores de ordem ética limitam a utilização de seres humanos em estudos com exposições controladas, grande parte dos estudos epidemiológicos realizados é do tipo observacional, isto é, quando voluntária ou involuntariamente pessoas são expostas a algum agente atmosférico potencialmente perigoso, analisam-se a relação entre as implicações e a intensidade dessa exposição[64].

A maioria dos estudos sobre o impacto da poluição atmosférica sobre a fertilidade e sucesso reprodutivo é do tipo epidemiológico. Entretanto, várias questões envolvidas no desenho e metodologia dos diferentes estudos realizados até hoje, entre as quais, a seleção e análise dos fatores de confusão (idade materna, forma de concepção, nível socioeconômico, estilo de vida, estado nutricional, etc.), o período e localização geográfica de exposição durante a gestação, a identificação das janelas de susceptibilidade, a definição do nível de exposição aos poluentes, assim como a exposição concomitante de múltiplos poluentes, tornam a interpretação dos resultados obtidos e sua comparação com outros estudos problemas em potencial na avaliação dos efeitos da poluição ambiental sobre fertilidade[66].

1.4.2. Estudos Experimentais

Complementando as observações obtidas pelos estudos epidemiológicos, mais especificamente utilizados para entender os mecanismos fisiopatológicos, os estudos toxicológicos experimentais são amplamente utilizados.

Para esse tipo de o estudo, utilizam-se principalmente roedores (camundongos e ratos), embora possam ser encontradas pesquisas com galinhas, peixes, entre outros.

Diversos sistemas para exposição à poluição atmosférica ou aos seus compostos têm sido utilizados.

A Escola de Saúde Pública de Harvard construiu um concentrador de partículas atmosféricas, que capta o ar ambiente e consegue concentrar o material particulado até uma taxa de 27 vezes da concentração original do ambiente, disponibilizando-os em uma câmara de exposição até poucos segundos de sua captação, evitando qualquer degradação de seus componentes[67, 68]. Estudos utilizando esse equipamento mostraram os danos causados pela poluição atmosférica sobre os sistemas respiratório e cardiovascular em animais[67-69].

O grupo do LPAE-FMUSP desenvolveu câmaras de topo aberto para a exposição ao ar ambiente e ao ar filtrado para investigar os efeitos da poluição atmosférica real da cidade de São Paulo sobre os diversos sistemas fisiológicos utilizando roedores e plantas como modelos experimentais[65]. Com essa metodologia, demonstrou-se o efeito maléfico da poluição atmosférica real sobre os sistemas cardiorrespiratório e reprodutivo em modelo animal, assim como o potencial mutagênico através de ensaios vegetais[49-51, 65, 70, 71].

Como em grandes centros urbanos, o maior vilão na qualidade de ar são as emissões automotivas, ensaios utilizando câmaras de intoxicação conectadas a motores têm sido desenvolvidos. Muitos estudos com essa metodologia apontam prejuízos da ED sobre os sistemas respiratório, cardíaco e reprodutivo, a gestação, gametogênese, diferenciação sexual e comportamento pós-natal, assim como indução de mutagenicidade utilizando roedores[55, 56, 58, 60, 72-74].

Outra metodologia utilizada para a intoxicação dos modelos animais é a instilação nasal ou traqueal dos produtos resultantes da queima dos combustíveis. Através dessa metodologia, vários efeitos foram identificados, como danos pulmonares e reprodutivos, além da obtenção da toxicidade relativa das diferentes frações dos combustíveis e tecnologias dos motores[63, 69, 75-79].

Embora pouco utilizada, outra metodologia de verificação da toxicidade dos produtos de exaustão dos combustíveis é a injeção intraperitoneal de soluções contendo esses compostos[54].

Woodruff *et al.*[66] reforçaram a importância dos estudos em modelos animais para informar os períodos de susceptibilidade gestacional à poluição atmosférica e os marcadores reprodutivos que são difíceis de avaliar através de dados epidemiológicos (por exemplo, perdas e desenvolvimento placentário), além de uma forma de verificar a toxicidade dos poluentes isolados ou em misturas com outras substâncias de interesse.

1.4.2.1. Ensaios "in vitro"

Ensaios *in vitro* de curta duração são amplamente aceitos em testes toxicológicos das mais variadas substâncias. Entre as vantagens apresentadas por esse método está o fato de ser rápido e apresentar custo relativamente baixo, além de fornecer resultados que permitem a avaliação de vários critérios, incluindo citotoxicidade e genotoxicidade[80]. A maior expectativa sobre esse tipo de ensaio é a possibilidade de

obter informações sobre os mecanismos de atuação dos agentes tóxicos, além de descobrir marcadores moleculares para a susceptibilidade e/ou intensidade desses efeitos[81].

Poucos estudos *in vitro* sobre a toxicidade do MP, em especial sobre as PED, são encontrados na literatura. Entretanto, esses muito contribuem para a elucidação dos mecanismos biológicos e da toxicidade relativa dos vários constituintes das PED.

Gong *et al.*[82] utilizaram-se de ensaios *in vivo* e *in vitro* para evidenciar os efeitos da PED sobre a inflamação vascular e arteriosclerose. Möller *et al.*[83] testaram diversas partículas ultrafinas, entre elas PED, em cultura de macrófagos e mostraram um efeito citotóxico. Um efeito dose-dependente sobre as funções de miócitos e o aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) por essas células também foi verificado um teste de cultivo *in vitro* de células cardíacas ventriculares de ratos neonatos[84]. Okayama *et al.*[85], usando uma metodologia semelhante, mostrou que danos aos cardiomiócitos são dose e tempo de exposição dependentes.

Até o momento, poucos ensaios *in vitro* avaliaram os efeitos diretos das PED sobre o sistema reprodutivo. Komatsu *et al.*[86] cultivaram uma linhagem comercial de células de Leydig de camundongo (TM3) e as expôs às PED em diferentes concentrações (1 µg/mL, 10 µg/mL, 100 µg/mL e 1000 µg/mL). O grupo mostrou um efeito dose-resposta significativo sobre a redução da viabilidade e proliferação celular e o aumento da expressão do gene antioxidante HO-1, indicando um aumento no dano oxidativo dessas células. Utilizando o cultivo de células dos testículos de embriões de galinha

juntamente com um composto orgânico presente na composição das DEP, Mi *et al.*[87] mostraram uma redução significativa da viabilidade das células testiculares e do número de espermatogônias, assim como o aumento do estresse oxidativo das células cultivadas na presença desse toxicante.

1.5. Biologia da Reprodução

1.5.1. Desenvolvimento Embrionário

O processo de embriogênese é complexo, e envolve eventos morfo-moleculares finamente regulados.

O desenvolvimento embrionário começa com a fertilização do oócito maduro pelo espermatozóide, e requer uma série de eventos complexos que garantem a perfeita fusão dos gametas e a origem de um embrião viável[88, 89]. Depois da fertilização, o controle do desenvolvimento inicialmente é controlado por transcritos e proteínas maternas contidas inicialmente no oócito[90]. Entretanto, logo o ovo fertilizado, chamado zigoto, sofre a transição materno-zigótica, caracterizada pela degradação desses transcritos maternos e concomitante ativação do genoma embrionário, que consiste em uma reprogramação nuclear, tornando seu genoma ativo para a produção dos transcritos que nortearão o desenvolvimento[90, 91].

O zigoto sofre repetidas divisões mitóticas, o que resulta em um rápido aumento do número de células do embrião. Estas células, chamadas blastômeros, tornam-se cada vez menores, pois, a clivagem é um processo caracterizado por intensa replicação do DNA e divisão celular em ausência de crescimento celular[92]. Após o terceiro ciclo de clivagem, os oito blastômeros tornam-se firmemente aderidos, processo chamado compactação, através do aumento da expressão de moléculas de adesão e do contato célula-a-célula[93]. Com o número cada vez maior de blastômeros devido às sucessivas clivagens, o embrião como um todo é capaz de ajustar sua posição dentro da zona pelúcida (ZP). Subseqüentemente, inicia-se a cavitação do blastocisto, primeiro com a secreção de vacúolos intracelulares, que, quando liberados se agregam para formar a blastocele[94]. Conforme a blastocele expande, a ZP se torna cada vez mais fina, e, finalmente, o blastocisto eclode dessa camada glicoprotéica e está pronto para a implantação.

1.5.2. Diferenciação da Massa Celular Interna e Trofectoderma

Com a formação do blastocisto, há a separação e diferenciação entre o TE e a MCI, formando-se o blastocisto[92]. A formação da MCI e do TE é a primeira grande diferenciação celular que ocorre no embrião. A MCI dará origem ao feto propriamente dito, enquanto o TE desenvolverá os tecidos extra-embrionários que dão suporte ao desenvolvimento do embrião/feto durante a gestação[95].

A formação das linhagens celulares do blastocisto (TE e MCI) envolve, essencialmente, a transformação de um padrão indeterminado de expressão de fatores genéticos em um padrão de expressão espacialmente restrito e regulamentado (linhagem-específica), concomitante com o estabelecimento das propriedades morfológicas dos blastômeros. Embora os recentes avanços na pesquisa indiquem vários mecanismos no processo de formação do blastocisto, assim como, micro-ambiente local e combinação de restrições topológicas, polaridade celular e sinalização de processos que conduzem à separação das populações de células do interior e exterior do blastocisto, o mecanismo completo desse evento ainda não são totalmente compreendido[94].

O TE e a MCI podem ser distinguidos molecularmente pela expressão de alguns transcritos linhagem-específicos; entre os quais, o *Cdx2* e o *Oct4*. O *Cdx2* é inicialmente detectado em alguns núcleos do embrião com 8 células[96] e se torna restrito às células externas no estágio de mórula[96, 97], é necessário para o prosseguimento da diferenciação destas células em trofoblasto[97]. Embriões mutantes, que não possuem a expressão de *Cdx2*, formam blastocistos aparentemente normais, mas marcadores de MCI, como *Oct4*, não são suprimidos no TE[97], indicando um defeito na distinção das linhagens MCI/TE. O trofectoderma *Cdx2*$^{-/-}$ eventualmente entra em colapso e sofre apoptose, levando o blastocisto à morte antes da implantação[98]. O *Oct4,* expresso inicialmente em todas as células do pré-embrião, passa a ser restrito à MCI, após a formação do blastocisto[99] e é um dos responsáveis pela manutenção da totipotência dessas células. Embriões com mutação nula para *Oct4* implantam, o que

indica a formação de um TE funcional, mas morrem rapidamente e apresentam a falta dos tecidos derivados da MCI como epiblasto e saco vitelino[100]. Desta forma, embriões homozigotos para a mutação nula de expressão de *Cdx2* ou *Oct4* aparentemente dão origem a blastocistos com as duas linhagens celulares, porém apresentam defeitos na segregação das células do TE e da MCI.

A integridade morfofuncional e molecular desses dois compartimentos embrionários é imprescindível para o estabelecimento e a continuação da gestação, uma vez que a MCI deve ser competente de originar um feto completo e saudável, enquanto o TE deverá formar uma placenta capaz de manter o desenvolvimento fetal e suprir suas necessidades.

1.5.2.1. Avaliação da Qualidade Embrionária

A maioria das informações obtidas sobre o desenvolvimento embrionário provém de estudos com modelos animais, especialmente camundongos, e da experiência dos procedimentos de fertilização assistida, uma vez que o desenvolvimento embrionário inicial é muito semelhante entre os diferentes mamíferos.

O parâmetro mais utilizado para a avaliação não invasiva da qualidade embrionária está baseado em observações da morfologia e das taxas de desenvolvimento embrionário. A avaliação da morfologia e do posicionamento dos dois pronúcleos, além do tamanho, número e disposição dos nucléolos está correlacionada a uma melhor taxa de desenvolvimento embrionário, com maiores índices de obtenção de

blastocistos e gestações, assim como ferramenta para predição da constituição cromossômica normal[101-103].

A presença de clivagem precoce[b], taxa de clivagem, blastômeros de tamanhos simétricos e de forma regular, ausência de fragmentação citoplasmática e multi-nucleação, granulação e vacúolos citoplasmáticos são outros marcadores importantes de qualidade e viabilidade embrionária[104-107].

Enquanto as características do zigoto e do pré-embrião estão correlacionadas à subseqüente formação blastocisto, este é positivamente correlacionado com o sucesso da implantação. A avaliação morfológica do blastocisto, leva em consideração a velocidade de desenvolvimento, expansão da cavidade embrionária, número e características das células da MCI e TE. A MCI deve ser um grupo celular compacto e bem definido, formado de células firmemente aderidas umas às outras, sem a possibilidade de delimitação individual das células, enquanto que o TE deve ser um epitélio coeso formado de muitas células pequenas e idênticas. Em relação ao status de expansão, quanto maior a blastocele e menor a espessura da ZP, mais avançado o desenvolvimento do blastocisto, assim como o tamanho da herniação do blastocisto através da ZP até a sua completa eclosão[108-110]. Experimentalmente, o número total de células do blastocisto e a razão celular entre MCI e TE está correlacionado com a qualidade e potencial de implantação do embrião[53, 111, 112].

---

[b] Ocorrência da primeira clivagem do zigoto entre 25-27h pós-inseminação

Apesar de avaliação morfológica ser o alicerce da análise da qualidade embrionária, há outros métodos menos utilizados, sejam por serem mais laboriosos e/ou onerosos, sejam por serem invasivos ou apenas experimentais. O diagnóstico genético pré-implantacional (DGP) avalia a presença de anomalias cromossômicas numéricas, mutações ou doenças gênicas[113]. A avaliação da expressão de genes essenciais ao desenvolvimento, análise de metabólitos, quantificação da morte celular programada por apoptose, produção de ERO, entre outros, ainda são ensaios experimentais utilizados na investigação da qualidade e competência embrionária[114-116].

1.5.3. Implantação Embrionária

O processo de implantação embrionária envolve uma série de interações entre os ovários, endométrio e embrião e, sendo necessária uma sincronização entre o estágio de desenvolvimento do embrião e a fase do ciclo uterino[117]. A implantação embrionária inicia-se com a eclosão do blastocisto da ZP, seguida pelo pré-contato do embrião com o epitélio uterino. Seguem-se a aposição entre o TE e o epitélio uterino, a adesão do trofectoderma a esse epitélio, e a invasão endometrial e no sistema circulatório da mãe, com a conseqüente formação da placenta[118, 119]. A ocorrência de falhas em qualquer uma das etapas da implantação pode afetar negativamente a eficiência deste processo[120].

Estudos sugerem que durante o período de receptividade uterina ocorre a expressão de genes particularmente relacionados a esse processo, e a presença ou ausência de seus receptores e ligantes determinam a resposta ao embrião[121-123]. A comunicação parácrina entre embrião e endométrio, que são dois organismos genética e imunologicamente distintos, leva a uma dinâmica molecular capaz de resultar no sucesso implantacional[124].

Experimentalmente, as avaliações citadas anteriormente junto com testes de adesão do blastocisto e desenvolvimento trofoblástico *in vitro* vêm sendo utilizadas como marcadores do potencial de implantação desses embriões[125-127].

1.6. Possíveis mecanismos de ação da poluição atmosférica sobre a fertilidade

As substâncias químicas presentes no ar ambiente podem alterar a fertilidade através de uma ação direta no sistema endócrino e/ou reprodutivo ou de uma ação indireta no sistema imune[128-131]. O efeito direto usualmente ocorre quando a substância química presente no meio ambiente apresenta uma similaridade estrutural a moléculas endógenas ou é transformada em metabólitos ativos. Uma vez presente nos órgãos reprodutivos, esta substância química poderia alterar os processos celulares tais como diferenciação, mitose, meiose, morte celular programada (apoptose), migração, comunicação intracelular, reparo do DNA, ou função mitocondrial ou ligar-se a macromoléculas tais como DNA, RNA e proteínas,

determinando uma alteração de suas funções[132, 133]. Estes efeitos resultariam em desenvolvimento anormal dos tecidos, de sua função ou de sua morte celular programada. Como exemplo, podemos citar o papel das mitocôndrias na produção do ATP necessário como fonte de energia para a normalidade do desenvolvimento e viabilidade dos oócitos e da embriogênese pré-implantacional[134, 135]. Substâncias químicas que tenham uma interferência direta na função mitocondrial determinariam a falha da maturação oocitária, da fertilização ou do desenvolvimento embrionário inicial. A ausência de substrato energético para a manutenção celular poderia determinar a interrupção do processo de citocinese e, conseqüentemente, a falha do desenvolvimento embrionário. Embriões com função mitocondrial reduzida apresentam taxas menores de divisão celular, expansão e eclosão dos blastocistos, o que poderia ser fatal para o seu desenvolvimento e implantação[135].

Estudos experimentais procurando possíveis mecanismos de ação dos poluentes ambientais sobre a saúde reprodutiva focados na interação entre os genes e o meio ambiente demonstraram um aumento das taxas de mutação da linhagem germinativa de camundongos expostos ao ar poluído, especialmente ao MP[136-138]. Nesses estudos, os autores sugerem os HPA, o MP ou metais pesados como grupos provavelmente responsáveis pelas elevadas taxas de mutação da linhagem germinativa nos animais expostos. Teoricamente, o dano elevado do DNA causado pela exposição à poluição atmosférica particulada determinaria uma regulação positiva das DNA metiltransferases (DNMT), resultando em hipermetilação ao longo do tempo. Um aumento da metilação dos gametas poderia causar problemas potenciais para a

prole devido à alteração da reprogramação epigenética do óvulo fertilizado[138]. Contudo, as implicações do aumento dessas taxas de mutação sobre a saúde reprodutiva dos animais e da população ainda são desconhecidas.

A poluição atmosférica possui diversos componentes com capacidade de disrupção endócrina, como os HPA, nitro-HPA, HC heterocíclicos e alifáticos, quinonas e aldeídos. Essas substâncias podem agir como hormônios e atravessar a membrana celular por difusão passiva. Uma vez dentro do citoplasma, estas substâncias podem interagir com os receptores esteróides, e induzir a ativação ou supressão de genes e determinar uma resposta biológica[129, 139]. Um estudo demonstrou a exposição de camundongos aos HAP induz a expressão da proteína pró-apoptótica *Bax* em oócitos, *Bax*, através da ativação transcripcional do receptor de hidrocarboneto aromático (Ahr) da região promotora do gene BAX, induzindo à morte celular[140]. Uma vez que os disruptores endócrinos podem agir no eixo hipófise-hipotálamo, alterando a produção, liberação e atuação dos hormônios Folículo Estimulante (FSH) e Hormônio Luteinizante (LH), conseqüentemente de estrógeno e progesterona[141], e, sabendo-se que a receptividade uterina à implantação embrionária é controlada por esses hormônios, a fertilidade, o desenvolvimento embrionário inicial e prosseguimento da gestação podem ser comprometidos.

Por outro lado, as substâncias químicas presentes no ar ambiente podem ter um efeito tóxico indireto através da interferência em sistemas não reprodutivos ou na síntese e metabolismo hormonal. O bi-fenil policlorinado pode alterar a função da

tireóide materna através da redução dos níveis de tiroxina, a qual determinaria uma alteração do desenvolvimento do trato reprodutivo fetal[128, 129, 142].

Há ainda, estudos demonstrando tanto os efeitos negativos da contaminação química do ar (gases anestésicos, HC, compostos aromáticos, agentes de limpeza, etc.) em laboratórios de fertilização *in vitro* quanto os efeitos positivos da construção de uma sala limpa "ISO 5" para a manipulação de gametas e de embriões sobre o desenvolvimento embrionário inicial e taxas de gestação após a fertilização *in vitro*[143-145].

Apesar de todos os achados descritos acima e das claras evidências de associação entre exposição atmosférica e desfechos reprodutivos, os efeitos da contaminação ambiental sobre a gestação têm sido avaliados sem a discriminação da susceptibilidade individual do útero e do embrião.

Observamos uma escassez de trabalhos correlacionando exposição à poluição atmosférica e efeitos embriotóxicos. Apenas Maluf *et al.*[53] e Perin *et al.*[63] estudaram a toxicidade de poluentes do ar sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional. Entretanto, ambos os trabalhos avaliaram apenas a exposição feminina e, como a fecundação e o desenvolvimento embrionário ocorreram *in vitro*, os efeitos observados podem ser devidos à ação da poluição atmosférica sobre a gametogênese, desta forma, os possíveis efeitos deletérios sobre as primeiras clivagens e sobre o início do desenvolvimento embrionário ficaram excluídos dessa análise.

Uma vez que o as PED correspondem à maior parte do material particulado urbano, avaliar os efeitos das PED é de grande importância para elucidar seus efeitos biológicos e bioquímicos, e pode ser importante para entender os efeitos adversos do MP sobre a saúde reprodutiva.

O que se propõe neste trabalho é a avaliação isolada dos efeitos das PED sobre o desenvolvimento embrionário inicial, traduzida pela avaliação do padrão de desenvolvimento e qualidade embrionária e o potencial de implantação desses embriões.

Objetivos

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem o objetivo de avaliar o efeito da exposição às partículas de exaustão do diesel sobre o desenvolvimento, qualidade e potencial de implantação embrionária, utilizando como modelo a fertilização *in vitro* e o cultivo embrionário de camundongos.

2.1. Objetivos Específicos

1. Avaliar o efeito da exposição *in vitro* às PED sobre o desenvolvimento embrionário inicial, utilizando as taxas de formação e eclosão de blastocistos;
2. Avaliar o efeito da exposição *in vitro* às PED sobre número total de células, bem como a alocação entre MCI e TE dos blastocistos com 120 hpi;
3. Avaliar o efeito da exposição *in vitro* às PED sobre padrão morfológico da MCI dos blastocistos com 120 hpi;
4. Avaliar o efeito da exposição *in vitro* às PED sobre o potencial de implantação dos embriões, através dos marcadores de desenvolvimento embrionário peri-implantacional: capacidade adesão do blastocisto em matriz extracelular definida e crescimento do trofoblasto

5. Avaliar o efeito da exposição *in vitro* às PED sobre a qualidade dos embriões, durante o período peri-implantacional através da morfologia da massa celular interna dos embriões aderidos a essa matriz;
6. Avaliar o efeito da exposição *in vitro* às PED sobre a taxa de células vivas, mortas e apoptóticas dos embriões expostos no estágio de blastocisto 120hpi;
7. Avaliar o efeito da exposição *in vitro* às PED sobre a taxa de células vivas e apoptóticas dos embriões no 8º dia de cultivo;
8. Avaliar o efeito da exposição in vitro às PED sobre taxa de expressão dos fatores *Cdx2* e o *Oct4* nos blastocistos, bem como a razão de expressão *Oct4/Cdx2*.

Métodos

3. MÉTODOS

Os protocolos utilizados no presente estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq 073/08).

3.1. Animais

Neste estudo, foram utilizados camundongos machos e fêmeas heterogenéticos, linhagem *SWISS* albino (Biotério Central, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo), com 8 – 10 semanas de idade. Os animais foram mantidos em grupos de 5 fêmeas ou 2 machos no biotério do Laboratório de Investigação Médica – LIM 05, em caixas de policarbonato com forração de maravalha, fotoperíodo claro-escuro de 12:12 h, umidade relativa de 50 ± 10% e temperatura de 24 °C ± 1 °C. Ração comercial balanceada (Nuvital-Nutrients Ltda., Colombo, Paraná, Brasil) e água fresca filtrada foram fornecidas *ad libitum*. Todos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os princípios de manutenção e bem-estar animal seguiram as normas estabelecidas pelos princípios de utilização de utilização e cuidados dos animais vertebrados utilizados em testes, pesquisas e treinamento do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos - "Principles of Laboratory Animal Care"[(146)].

3.2. Partículas de Exaustão do Diesel: coleta, caracterização e preparo.

As PED foram coletadas através de um dispositivo retentor de partículas adaptado ao tubo de escape de um ônibus da frota de transporte público de São Paulo, equipado com um motor Mercedes Benz MB1620, 210 hp, sem controle eletrônico de injeção de combustível, alimentado com diesel metropolitano, cujo teor de enxofre é 500 ppm. Este tipo particular de ônibus foi escolhido por ser o mais freqüente em operação na cidade de São Paulo, com base nas informações fornecidas pelo órgão municipal competente. As PED foram coletadas após um dia de operação de rotina e armazenadas para estudos toxicológicos.

Os componentes orgânicos e metálicos presentes nas PED foram analisados. A composição elementar foi determinada por espectrometria de fluorescência dispersiva de raios X (EDX 700HS; Shimatzu Corporation Analytical Instruments Division, Kyoto, Japão). Os componentes orgânicos foram analisados por espectrometria de absorção atômica (AA-1475, Varian; Victoria, Austrália).

As diferentes concentrações das soluções utilizadas nesse estudo (10 µg/mL, 100 µg/mL, e 1000 µg/mL) foram preparadas através de diluição seriada das PED em meio de cultivo embrionário simples enriquecido com potássio e otimizado com glicose e aminoácidos (KSOMaa, MR-107; Specialty Media, Chemicon, Phillipsburg, NJ, EUA) seguida por sonicação durante 10 minutos em um banho de ultra-som (1510; Branson, Danbury, CT). Todas as soluções estoque foram armazenadas a 4 °C e sonicadas por 5 minutos imediatamente antes do uso.

3.3. Meios de Cultivo e Fertilização in vitro

Os procedimentos de fertilização *in vitro* (FIV) e o cultivo embrionário foram realizados de acordo com protocolos já estabelecidos[112]. Resumidamente, diferentes meios de cultivo foram utilizados para cada etapa da FIV: [1] Meio de coleta, para a recuperação dos oócitos da tuba uterina e isolamento da cauda epididimária e ducto deferente: Fluído Tubário Humano modificado com HEPES (mHTF, 90126; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, EUA) pré-aquecido a 37 °C; [2] Meio de inseminação, para a recuperação e capacitação dos espermatozóides e co-cultivo dos gametas para FIV: Fluído Tubário Humano (HTF, 90125; Irvine Scientific) contendo 10% de soro substituto sintético (SSS, 99193; Irvine Scientific); [3] para o cultivo embrionário foi usado KSOMaa suplementado com 5 mg/mL de albumina sérica humana (HSA solution, 10064; Vitrolife AB, Gothenburg, Suécia). As placas com os meios de inseminação e cultivo embrionário foram preparadas, recobertas com óleo mineral para o cultivo de embrião (Oil for Embryo Culture, 9305; Irvine Scientific) e equilibradas de um dia para o outro em atmosfera com umidade saturada e 5% CO_2 em ar a 37 °C. O mesmo lote de cada meio de cultivo foi utilizado em todos os experimentos. Os oócitos foram obtidos de fêmeas de 8 semanas de idade (n = 50) utilizando injeção intra-peritoneal (IP) de 10 UI de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG, Folligon, 1000 IU; Intervet Internacional, São Paulo, São Paulo, Brasil) seguida 48 h depois por injeção IP de 10 UI de gonadotrofina coriônica humana (hCG, Choragon, 5000 IU; Ferring, São Paulo, São Paulo, Brasil). As fêmeas foram sacrificadas 14–16 horas após a administração da hCG e a região ampolar de cada oviduto foi retirada. Os complexos cumulus-oophorus

(COC) recém-ovulados foram liberados da ampola da tuba uterina com a ajuda de duas agulhas hipodérmicas e colocados em meio de inseminação. Para obter espermatozóides, machos de 10 semanas de idade, com fertilidade comprovada, foram sacrificados 12-13 horas após as fêmeas receberem a injeção de hCG, e a cauda do epidídimo e vaso deferente foram removidos de cada testículo e colocados em meio de inseminação. Os espermatozóides foram gentilmente liberados utilizando uma pinça de relojoeiro e o tecido residual foi descartado. A capacitação espermática ocorreu pela incubação do sêmen por 60–90 minutos a 37 °C em 5% CO_2. FIV e cultivo embrionário foram realizados em incubadora com sistema de filtragem de partículas e gases HEPA-VOC (Series II Water Jacketed Incubator, 3110; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). Para a FIV, os gametas foram misturados e incubados por um período de 4–6 horas.

3.4. Delineamento Experimental

Após a verificação da fertilização, grupos 10 zigotos foram cultivados em gotas de 20 µL de meio de cultivo com as concentrações pré-determinadas de PED (0, 1 µg/mL, 10 µg/mL e 100 µg/mL).

A unidade de concentração de PED foi convertida de microgramas por mililitro (µg/mL) para microgramas por centímetro quadrado (µg/cm^2) devido à rápida sedimentação das partículas no meio de cultivo. Desta forma, 1 µg/mL, 10 µg/mL, e 100 µg/mL são equivalentes a 0,2 µg/cm^2, 2 µg/cm^2, e 20 µg/cm^2, respectivamente,

sendo 10 µg/cm^2 relevante para a concentração de $MP_{2,5}$ encontrado em ar urbano[147]. A atividade de endotoxinas nas PED (100 µg/mL) foi medida utilizando teste específico: PyroGene Recombinant Factor C assay (Lonza, Walkersville, MD, EUA) e foi abaixo do valor de detecção (0,01 EU/mL). A osmolaridade e o pH do meio após a adição das soluções estoques permaneceram dentro do intervalo de 280-300 mOsm e 7,20 – 7,30, respectivamente.

O desenvolvimento embrionário *in vitro*, a segregação celular e morfologia da ICM dos blastocistos em 120 horas após a inseminação (hpi) foram avaliadas em todos os grupos experimentais (Experimento 1). Entretanto, devido ao alto efeito negativo significativo da concentração de 20 µg/cm² de PED sobre o desenvolvimento embrionário inicial, este grupo foi excluído das análises subseqüentes. Deste modo, os experimentos de capacidade de adesão e crescimento do trofectoderma em matriz extracelular (MEC) definida, morfologia da massa celular interna do embriões aderidos à MEC, taxas de viabilidade e apoptose celular e taxa de expressão de *Oct4* e *Cdx2* foram realizados apenas em embriões obtidos dos grupos experimentais 0 µg/cm^2, 2 µg/cm^2 e 2 µg/cm^2 (Experimento 2). Os zigotos foram distribuídos igual e aleatoriamente entre os diferentes grupos de exposição de maneira que somaram aproximadamente 225 e 95 zigotos por grupo nos experimentos 1 e 2, respectivamente.

3.5. Avaliação Embrionária

As avaliações foram realizadas sob aumento de 200x de um microscópio invertido com estágio aquecido (≈ 37 °C) (Eclipse TE2000-U com módulo de contraste Hoffman; Nikon Melville, NY, EUA) no intervalo de aproximadamente 6, 96, e 120 hpi (dias 1, 4, e 5, respectivamente). A verificação da fertilização foi procedida 6–8 hpi; oócitos apresentando dois corpúsculos polares e dois pronúcleos foram considerados normalmente fertilizados (Figura 1).

Figura 1: Fotografia ilustrativa de um oócito de camundongo normalmente fertilizado. Note a presença de dois corpúsculos polares (às 9h o 1º corpúsculo polar degenerado) e dois pró-núcleos.

Nos dias 4 e 5, morfologia embrionária, estágio do desenvolvimento, número de embriões que chegaram ao estágio de blastocisto (com a blastocele ocupando pelo menos 80% do volume total do embrião), e número de blastocistos que ao menos começaram o processo de eclosão foram aferidos. A classificação da morfologia do blastocisto foi baseada no critério descrito por Gardner e Lane[(148)]. O padrão de eclosão dos blastocistos (Figura 2), avaliado no dia 4 e 5, foi graduado em uma escala

de 4 pontos, de 0 a 3, sendo 0 = ausência de eclosão, 1 = inicial (herniação através da ZP menor que 50% do embrião), 2 = parcial (herniação através da ZP pelo menos 50% do embrião), e 3 = blastocisto totalmente eclodido. Um escore balanceado, representado pela soma da graduação da eclosão de cada blastocisto, dividido pelo total de número de blastocistos em cada condição de cultivo, foi calculado para as avaliações 96 e 120 hpi (Escore 96 e Escore 120, respectivamente). Para balancear o grau de eclosão e o potencial de desenvolvimento dos embriões, um sistema de escore discriminatório (Escore D) previamente descrito por Maluf *et al.*[53] foi utilizado. Resumidamente, o Escore D foi calculado pela equação:

$$Escore\ D = ((Score120/3) + (Score96/3)) - ((Score120 - Score96)/6)$$

Esse sistema de graduação resulta em um escore máximo de dois, pois:

$$[(3/3) + (3/3)] - [(3-3)/6] = 2.$$

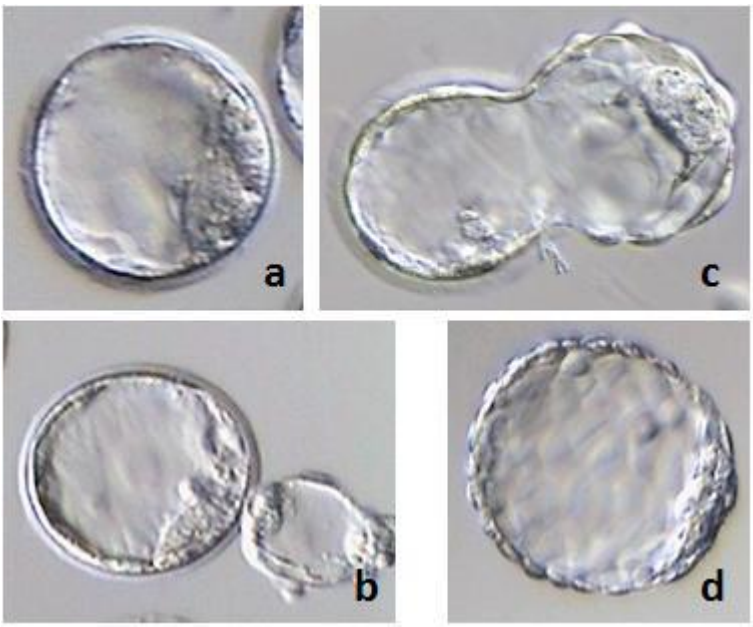

Figura 2: Diferentes estágios de eclosão do blastocisto (96 e 120 hpi): a) graduação 0 = ausência de eclosão; b) graduação 1 = inicial (herniação através da ZP menor que 50% do embrião); c) graduação2 = parcial (herniação através da ZP pelo menos 50% do embrião) e; d) graduação 3 = blastocisto totalmente eclodido.

3.6. Contagem Diferencial das Células da Massa Celular Interna e do Trofectoderma e Morfologia da Massa Celular Interna

No dia 5 de cultivo (120 hpi), a contagem diferencial das células MCI e do TE de três blastocistos produzidos *in vitro* selecionados aleatoriamente de cada grupo experimental foi realizada através de uma modificação da técnica descrita por Thouas *et al.*[111]. Os blastocistos intactos foram incubados em grupo de três por aproximadamente 10 segundos (ou até TE visivelmente mudar de cor) em 500 µL de meio HTF contendo 50 µg/mL iodeto de propídeo (PI, Propidium Iodide Nucleic Acid Stain, P-3566; Invitrogen Corporaton, Carlsbad, CA, EUA) e 1% Triton X-100 (TX-100; Sigma, St. Louis, MO, EUA). Então, os blastocistos foram transferidos para solução de fixação contendo 25 µg/mL de bisbenzimide (Hoechst 33258, H3569; Invitrogen) e

100% álcool etílico (etanol PA, 1009831000; Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e armazenados de um dia para o outro a 4 °C. Os blastocistos corados e fixados foram transferidos individualmente para uma gota de glicerol em lâmina de microscopia, colocados sob lamínula e visualizados para a contagem das células e avaliação morfológica da MCI, ambas realizadas através de fotografias digitais das imagens obtidas pelo microscópio de epifluorescência (Eclipse 90i; Nikon) equipado com lâmpada de mercúrio (X-Cite 120 Fluorescence Illumination System; Exfo – Photonic Solutions Inc., Ontario, Canadá) e filtros de 460 nm e 560 nm, no aumento de 400x. A distribuição dos núcleos das células da MCI foi graduada em uma escala de 3 pontos de 1 a 3 (Escore MCI), sendo 1 = núcleos da MCI densamente compactados em uma região restrita do blastocisto, 2 = núcleos da MCI frouxamente compactados em uma região restrita do blastocisto, e 3 = núcleos da MCI espelhados pelo blastocisto (Figura 3). A avaliação da morfologia da MCI e a contagem de todas as células foram realizadas por um examinador que desconhecia os grupos experimentais.

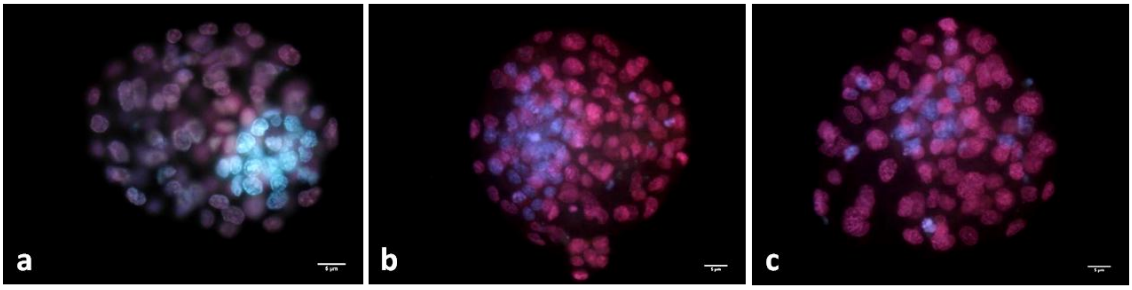

Figura 3: Fotografias de embriões corados pela técnica da coloração diferencial. Células do trofectoderma (TE) na cor rosa, enquanto células da massa celular interna (MCI) em azul. Cada embrião apresenta uma classificação da integridade morfológica da MCI: a) Escore MCI 1 = núcleos da MCI densamente compactados em uma região restrita do blastocisto; b) Escore MCI 2 = núcleos da MCI frouxamente compactados em uma região restrita do blastocisto e; c) Escore MCI 3 = núcleos da MCI espelhados pelo blastocisto.

3.7. Teste de Adesão do Blastocisto e Crescimento do Trofectoderma

O teste de adesão do blastocisto e crescimento trofoblástico, consiste no cultivo dos embriões que chegaram ao estágio de blastocisto eclodido no quinto dia de cultivo em MEC definida de fibronectina a 37 °C em 5% CO_2 até o oitavo dia[149, 150]. Resumidamente, placas de quarto fossos (144444; Nunc, Roskilde, Dinamarca) foram preparadas incubando uma lamínula estéril de 12 mm de diâmetro com 400 µl de fibronectina (F1141; Sigma) a 10 mg/mL em solução salina tamponada (PBS) a 4 °C em cada fosso. No dia seguinte, os poços foram lavados três vezes com 400 µl de PBS, seguida por uma incubação com 400 µl de PBS suplementado com 10% de soro albumina bovina (BSA, 1092; Irvine Scientific) durante 1 h a temperatura ambiente. A seguir, fossos foram lavados três vezes com 400 µl de meio de cultivo Eagle-Dulbecco modificado (Dmem F12, 10565-018; Invitrogen) e, finalmente, preenchidos com 400 µl do meio Dmem F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; HyClone, Logan, UT, EUA) pré-equilibrado e cobertos com óleo para cultivo embrionário. As placas de cultivo foram re-equilibradas durante o período de ao menos 2 h a 37 °C e 5% CO_2 antes da adição dos embriões. Blastocistos totalmente eclodidos (dia 5) de cada grupo experimental (0 µg/cm^2; 0,2 µg/cm^2 e 2 µg/cm^2) foram distribuídos individualmente em cada poço previamente preparado, e incubados por 72 h. A adesão do embrião à MEC de fibronectina foi quantificada no dia 6 através da contagem do número de blastocistos que permaneceram aderidos à fibronectina depois de leve agitação em movimentos circulares da placa de cultivo[151]. A adesão e crescimento trofoblástico foi

verificada através do microscópio invertido no aumento de 100x. A área de adesão do embrião, expressa em µm², foi medida depois de 24 h (dia 6) e 72 h (dia 8) de cultura na MEC através das imagens capturadas durante a avaliação utilizando o programa ImageJ (ImageJ 1.43e, US NIH, EUA[152]) e o crescimento trofoblástico calculado como a diferença entre as áreas do dia 8 e dia 6. Foi realizada a graduação morfológica da MCI no dia 8 de cada embrião aderido, em uma escala de 4 pontos (Escore MCIo), sendo 1 = MCI formada muitas células densamente agrupadas (corpos embrióides), 2 = MCI apresentando muitas células agrupadas de frouxamente, 3 = MCI constituída por poucas células e 4 = ausência de MCI (Figura 4).

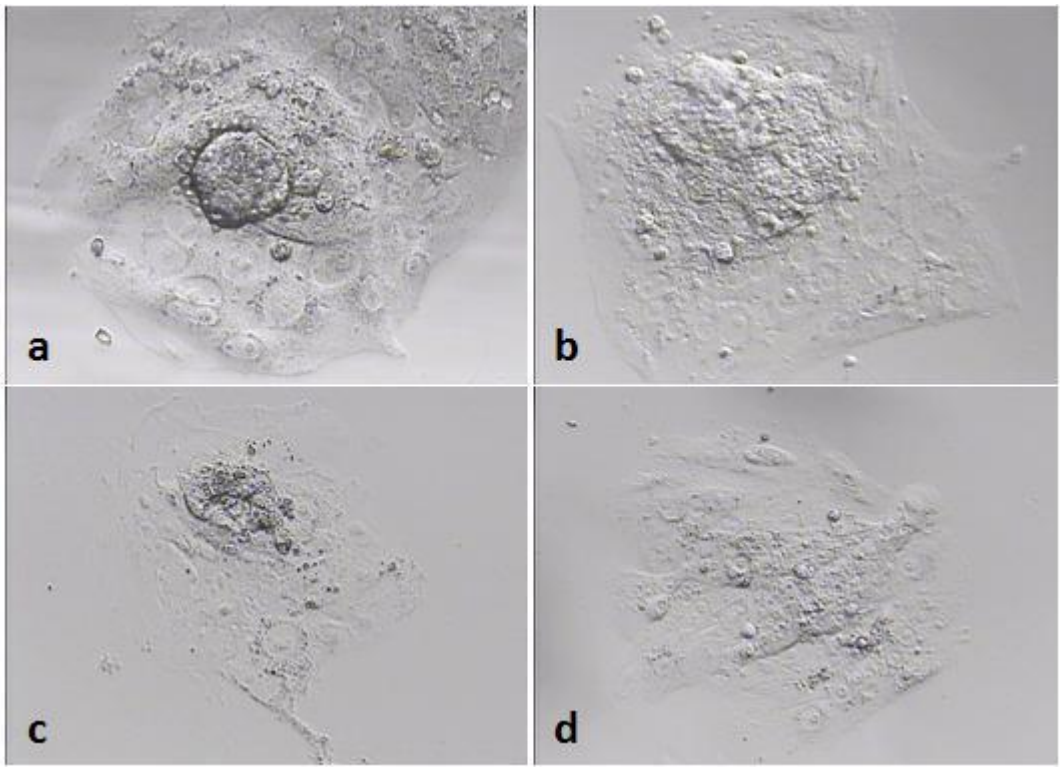

Figura 4: Fotografias ilustrativas da graduação da morfologia da massa celular interna (Escore MCIo) dos embriões aderidos à matriz extracelular de fibronectina. Em a) Escore MCIo = 1, formada muitas células densamente agrupadas; b) Escore MCIo = 2, muitas células agrupadas de frouxamente; c) Escore MCIo = 3, constituída por poucas células e; d) ausência de MCI, Escore MCIo = 4.

3.8. Detecção de Apoptose e Morte Celular

A detecção da apoptose celular foi realizada através da técnica de marcação do entalhe terminal dUTP presente no DNA fragmentado (TUNEL), utilizando o kit para detecção de morte celular *in situ* marcado com fluoresceína (In situ cell death detection system, 11684795910; Roche, Indianapolis, IN, EUA) de acordo com as orientações do fabricante. A distinção entre necrose e apoptose foi realizada pela característica perda da permeabilidade seletiva da membrana das células mortas, evidenciada pela incorporação do marcador nuclear PI[153]. Resumidamente, blastocistos no dia 5 e os embriões aderidos à matriz de fibronectina no dia 8 de cultivo foram incubados por 15 minutos a 37 °C em 200 µl de meio de cultivo com PI (10 µg/mL). A seguir, lavados três vezes em 200 µl PBS suplementado com PVP a 1 mg/mL (Polivinil-pirrolidona, PVP-360; Sigma), PBS/PVP, e fixados em 200 µl de 4% de paraformaldeído (PFA, 158127; Sigma) em PBS por 30 minutos. Após a fixação, foram triplamente lavados em PBS/PVP, permeabilizados em 200 µl de 0,5% TX-100 e 0,1% de Citrato de Sódio (1064481000; Merck) em PBS por 30 minutos a temperatura ambiente e, mais uma vez, lavados três vezes com PBS/PVP. Foram, então, incubados com 50 µl do coquetel de reação de TUNEL a 37 °C por 1 h, protegidos da luz. Após a incubação com o coquetel de TUNEL e nova lavagem tripla em PBS/PVP, os embriões foram incubados por 20 minutos em 200 µl de 50 µg/mL de RNAse A (R6513; Sigma) em PBS a 37 °C no escuro. Finalmente, oram novamente lavados em PBS/PVP antes de serem colocados em lâmina de microscopia com meio de montagem contendo marcador nuclear (4,6'-diamidino-2-phenylindole, DAPI) (UltraCruz Mounting Medium,

sc-24941; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Controles positivos e negativos foram utilizados para avaliação da reação. Para o controle positivo, antes da incubação com o coquetel de reação do TUNEL, alguns embriões foram incubados por 30 minutos a 37 °C em 200 µl de PBS contendo 50 U/mL de DNAse (RNAse free DNAse I, AM2222; Ambion Inc., Austin, TX, EUA). Para o controle negativo, os embriões foram incubados na ausência da enzima terminal transferase, ingrediente ativo do coquetel de reação para TUNEL. Desta maneira, as células mortas foram visualizadas com os núcleos corados em azul e vermelho (PI), os núcleos das células em apoptose em azul e verde (fluoresceína), enquanto os núcleos das células viáveis foram marcados somente em azul (DAPI) (Figura 5). Os embriões foram avaliados sob microscópio de epifluorescência, objetiva de 40x, utilizando-se os filtros específicos para cada fluoróforo (460 nm para azul, 500 – 575 mm para verde e vermelho). A contagem das células foi realizada por um examinador que desconhecia os grupos experimentais, através das imagens adquiridas.

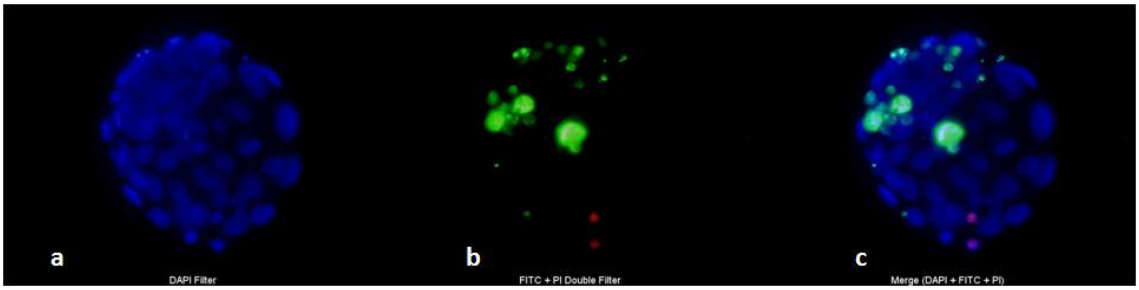

Figura 5: Imagens ilustrativas de um embrião (120 hpi) corado para a detecção de morte e apoptose celular. Em a) fotomicrografia do embrião visualizado no filtro DAPI; b) este embrião no mesmo plano focal visto através do filtro específico para o iodeto de propídeo (vermelho) e o FITC (verde) e; em c) a sobreposição das duas imagens anteriores. Após a sobreposição das imagens, os núcleos visualizados em verde representam as células em apoptose, os núcleos das células mortas são visualizados em rosa, enquanto as células viáveis, foram marcadas com a contra-coloração azul.

3.9. Contagem das células Oct4 *e* CDX2

Para a diferenciação e contagem das células que expressam os fatores de transcrição Oct4 ou Cdx2, foi utilizada a técnica de marcação por imunofluorescência baseada em Strumpf *et al.*[97].

Ambos os anticorpos primários utilizados foram fornecidos pela Santa Cruz Biotechnology: anticorpo policlonal de coelho anti-Oct4 (sc-9081) usado na diluição 1:100 e anticorpo policlonal de cabra anti-Cdx2 (sc-19478), na diluição 1:50. Os anticorpos secundários utilizados na diluição 1:400 foram: anti-imunoglobulina de coelho produzido em galinha conjugado com Alexa 594 (A21442; Invitrogen) e anti-imunoglobulina de cabra produzido em jumento conjugado com Alexa 488 (A11055; Invitrogen).

Vinte embriões no dia 5 de cultivo foram selecionados aleatoriamente de cada grupo experimental (0 $\mu g/cm^2$; 0,2 $\mu g/cm^2$ e 2 $\mu g/cm^2$) foram primeiramente lavados 3 vezes em PBS suplementado com 10% de BSA, fixados em 4% de paraformaldeído em PBS por 30 minutos, lavados como anteriormente e permeabilizados em 0,5% de TX-100 em PBS. A seguir, foram incubados em solução de bloqueio (SB) constituída por 0,1% de TX-100 e 10% de BSA em PBS por 1 hora a temperatura ambiente e, então, incubados por 18 horas a 4 °C com os anticorpos primários diluídos em SB. Os embriões foram lavados 3 vezes em SB, sendo 2 minutos as primeiras duas lavagens e a última com duração de 30 minutos. Seguiu-se a incubação com os anticorpos

secundários diluídos em SB por 1 hora a temperatura ambiente e lavagem tripla em SB como anteriormente. Os embriões foram, então, incubados por 20 minutos a temperatura ambiente em 50 µg/mL de RNAse A em SB e montados em lâmina de microscopia com UltraCruz Mounting Medium. O controle negativo da reação foi realizado através da incubação de alguns embriões na ausência dos anticorpos primários. Os embriões foram visualizados sob microscópio de epifluorescência, objetiva de 40x, utilizando-se os filtros específicos para cada fluoróforo (460 nm para azul, 500 – 575 mm para verde e vermelho). Assim, a distinção entre os tipos celulares foi realizada através da cor do núcleo, os núcleos corados em vermelho representam células que expressavam *Oct4*, enquanto que as células positivas para o fator de transcrição *Cdx2* foram visualizadas em verde. A contagem das células contagem foi realizada por um examinador alheio aos grupos experimentais, através das imagens adquiridas.

3.10. Análise Estatística

No Experimento 1, para a avaliação do desenvolvimento morfológico dos zigotos *in vitro*, a unidade experimental foi o número de embriões por grupo experimental. As variáveis dependentes para essas avaliações incluem a formação de blastocisto em 96 e 120 hpi, Escore D, contagem total de células, número de células da MCI e TE, razão de células MCI/TE e Escore MCI. Os efeitos das concentrações distintas de PED em cada variável dependente foram avaliados com análise de variância multivariada

(MANOVA). Utilizou-se o teste *post-hoc* HSD-Tukey (Tukey Honestly Significant Difference) para todas as comparações das variáveis dependentes entre os grupos.

No Experimento 2, o número de blastocistos por grupo experimental foi usado como unidade experimental e as variáveis independentes incluem as porcentagens de células vivas, apoptóticas e necróticas e de células expressando *Oct4* e *Cdx2*, e a razão *Oct4*/*Cdx2* dos blastocistos 120 hpi, e crescimento trofoblástico, Escore MCIo e porcentagem de células vivas e apoptóticas no dia 8 de cultivo. O modelo de regressão logística multivariada foi utilizado para avaliar o efeito das concentrações distintas de PED sobre a capacidade de adesão dos embriões sobre a MEC de fibronectina no sexto dia de cultivo embrionário. Para avaliação dos efeitos sobre as demais variáveis dependentes foi utilizada a análise de variância multivariada (MANOVA), seguida do teste *post-hoc* HSD-Tukey (Tukey Honestly Significant Difference).

Todos os dados em porcentagem foram submetidos à transformação arco-seno. Uma lista de números aleatórios gerada por computador foi utilizada quando a randomização era necessária. Os dados foram analisados usando o programa Statistical Package for the Social Sciences, version 13.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, EUA).

Resultados

4. Resultados

4.1. Caracterização das Partículas Exauridas do Diesel

Conforme a espectrometria de fluorescência dispersiva de raios X as PED utilizadas nesse trabalho apresentaram as seguintes concentrações de metais: cádmio – 0,029 ± 0,008 ppm; cromo – 0,161 ± 0,116 ppm; cobre – 0,017 ± 0,001 ppm; ferro – 74,556 ± 2,266 ppm; chumbo – 0,050 ± 0,047 ppm; níquel – 0,181 ± 0,037 ppm; enxofre – 0,626 ± 0,416 ppm; e vanádio – 0,037 ± 0,013 ppm.

Os componentes orgânicos identificados na amostra (peso seco em ng/g) incluem: acenaftileno, 179,48; antraceno, 94,73; benz[a]antraceno, 1162,73; benzo[a]pireno, 1642.28; benzo[b]fluoranteno, 789.93; benzo[k]fluoranteno, 562,8; fluoreno, 683.94; naftaleno, 49,23; e pireno, 12.838,27.

4.2. Experimento 1

Efeitos no desenvolvimento embrionário *in vitro* e na segregação celular

As médias (± DP) para todas as variáveis de desenvolvimento embrionário *in vitro*, segregação celular e morfologia da MCI no estágio de blastocisto de acordo com as concentrações de PED são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1: Efeitos do cultivo *in vitro* de zigotos por 120 hpi em diferentes concentrações de partículas exauridas do diesel (PED) sobre o desenvolvimento embrionário e a segregação celular dos blastocistos

Variável Dependente	Concentração de PED (µg/cm^2)			
	0	**0,2**	**2**	**20**
Desenvolvimento Embrionário				
% Blastocisto (96 hpi)	0,67 ± 0,19	0,54 ± 0,15	0,40 ± 0,25	0,03 ± 0,04
% Blastocisto (120 hpi)	0,78 ± 0,13	0,78 ± 0,09	0,62 ± 0,22	0,15 ± 0,05
Escore D	0,67 ± 0,09	0,52 ± 0,18	0,37 ± 0,17	0,13 ± 0,07
Segregação Celular				
Nº total de células	129,0 ± 6,6	124,4 ± 10,8	115,2 ± 11,0	108,7 ± 2,5
Nº de células MCI	29,9 ± 2,5	18,2 ± 3,5	14,6 ± 6,5	10,3 ± 4,1
Nº de células TE	99,1 ± 7,3	106,2 ± 12,4	100,6 ± 9,0	98,4 ± 4,3
Razão MCI/TE	0,31 ± 0,04	0,17 ± 0,04	0,15 ± 0,07	0,11 ± 0,05
Escore MCI	1,3 ± 0,4	2,0 ± 0,3	2,3 ± 0,4	2,5 ± 0,5

Um efeito multivariado para as diferentes concentrações de PED sobre o desenvolvimento embrionário e a alocação celular nos blastocistos foi encontrado (Wilks' Lambda = 0,02; F = 4,08; P = 0,000; poder = 0,99). A análise univariada do efeito da exposição a diferentes concentrações de PED em cada parâmetro de desenvolvimento e qualidade embrionária é mostrada na Tabela 2. As diferentes concentrações de PED não apenas prejudicaram significativamente o desenvolvimento embrionário inicial, como também alteram a segregação celular em 120 hpi, exceto o número de células no TE.

Tabela 2: Análise em modelo linear geral multivariado: efeito individual das variáveis independentes – Desenvolvimento Embrionário e Segregação Celular

Variável Dependente	Concentração de PED	
	F	P
% Blastocisto (96 h)	12,318	0,000
% Blastocisto (120 h)	24,234	0,000
Escore D	14,181	0,000
Nº total de células	5,811	0,007
Nº de células MCI	18,141	0,000
Nº de células TE	0,813	0,505
Razão MCI/TE	14,540	0,000
Escore MCI	7,118	0,003

A comparação *post-hoc* dos efeitos da exposição às concentrações distintas de PED sobre os parâmetros de desenvolvimento embrionário inicial e de segregação celular dos blastocistos mostrou diferenças significativas entre os grupos (Tabela 3). Nenhum efeito sobre o desenvolvimento embrionário foi encontrado na concentração de 0,2 $\mu g/cm^2$. A exposição a 2 $\mu g/cm^2$ de PED não resultou em efeitos sobre as taxas de formação de blastocisto nos dias 4 e 5 de cultivo, mas afetou significativamente o grau de eclosão e o potencial de desenvolvimento através de um Escore D baixo. Prejuízos significativos sobre todas as variáveis de desenvolvimento embrionário foram observados na concentração de 20 $\mu g/cm^2$.

Tabela 3: Comparação dos efeitos das diferentes concentrações de partículas exauridas do diesel (PED) presentes no meio de cultivo *in vitro* sobre o desenvolvimento embrionário e a segregação celular no estágio de blastocisto 120 hpi

Dependente Variável	Sub-grupo 1		Sub-grupo 2		Sub-grupo 3	
	Concentração ($\mu g/cm^2$)	Média ± DP	Concentração ($\mu g/cm^2$)	Média ± DP	Concentração ($\mu g/cm^2$)	Média ± DP
% Blastocisto (96 hpi)	0	0,67 ± 0,19	20	0,03 ± 0,04		
	0,2	0,54 ± 0,15				
	2	0,40 ± 0,25				
% Blastocisto (120 hpi)	0	0,78 ± 0,13	20	0,15 ± 0,05		
	0,2	0,78 ± 0,09				
	2	0,62 ± 0,22				
Escore D	0	0,67 ± 0,09	2	0,37 ± 0,17	100	0,13 ± 0,07
	0,2	0,52 ± 0,18				
Nº total de células	0	129,0 ± 6,6	20	108,7 ± 2,5		
	0,2	124,4 ± 10,8				
	2	115,2 ± 11,0				
Nº de células MCI	0	29,9 ± 2,5	0,2	18,2 ± 3,5		
			2	14,6 ± 6,5		
			20	10,3 ± 4,1		
Razão MCI/TE	0	0,31 ± 0,04	0,2	0,17 ± 0,04		
			2	0,15 ± 0,07		
			20	0,11 ± 0,05		
Escore MCI	0	1,3 ± 0,4	2	2,3 ± 0,4		
	0,2	2,0 ± 0,3	20	2,5 ± 0,5		

$P<0,05$, sub-grupo 1 vs. sub-grupo 2 vs. sub-grupo 3 (*post-hoc* utilizando Teste de Tukey HSD, depois de MANOVA)

A Figura 6 mostra a distribuição do número total de células, número de células na MCI e TE, e a razão celular entre MCI e TE dos blastocistos (120 hpi) originados de zigotos cultivados em KSOMaa contendo as diferentes concentrações de PED. Todas as doses de PED mostraram um efeito significativo sobre o número de células da MCI e razão MCI/TE, embora nenhuma diferença significativa tenha sido encontrada sobre o número de células no TE. A contagem do número total de células não foi afetada pelas concentrações de 0,2 µg/cm^2 e 2 µg/cm^2, mas foi significativamente reduzida na presença de 20 µg/cm^2 de PED. A integridade morfológica da MCI foi significativamente prejudicada tanto na concentração de 2 µg/cm^2 quanto 20 µg/cm^2.

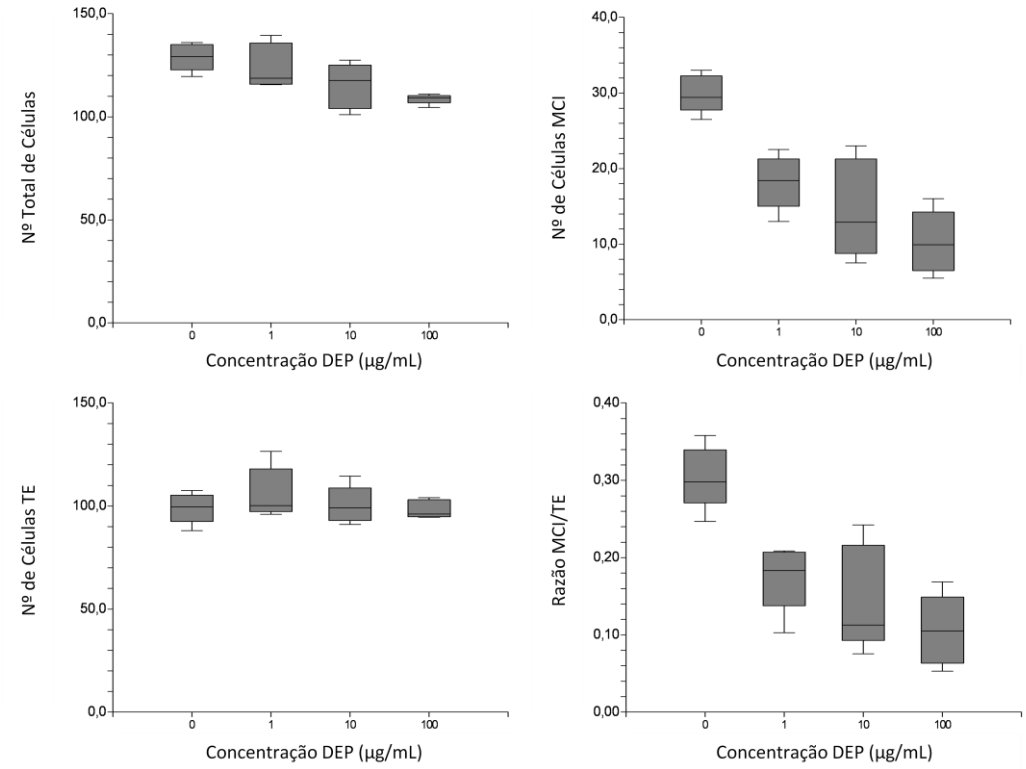

Figura 6: Diagrama de caixas retratando a distribuição de: a) número total de células; b) número de células na MCI; c) número de células no TE e; d) razão MCI/TE em blastocistos (120 hpi) originados de zigotos cultivados em KSOMaa contendo nas diferentes concentrações de PED.

4.3. Experimento 2

Efeitos sobre o desenvolvimento peri-implantacional

As taxas de adesão dos blastocistos à MEC de fibronectina do dia 6 foram 65,2%, 47,8% e 58,3% para as concentrações de 0 µg/cm^2, 0,2 µg/cm^2 e 2 µg/cm^2 de PED, respectivamente, não mostrando nenhuma diferença significativa entre os grupos de exposição (Wald Z-value = 1,154; P = 0,562). Para avaliar o efeito da exposição às diferentes concentrações de PED sobre a atividade migratória do trofoblasto, a área de crescimento trofoblástico foi medida. Um efeito multivariado das concentrações de PED sobre a área de crescimento do trofoblasto e a área da MCIo foi encontrado (Pillai's trace = 0,15; F = 3,00; P = 0,020; poder = 0,789). Após 72 h de cultivo em MEC, nenhuma diferença significativa foi encontrada na área de crescimento trofoblástico entre os blastocistos expostos às concentrações de PED de 0 µg/cm^2 (126696,5 ± 53795,6 µm^2), 0,2 µg/cm^2 (110242,8 ± 52017,4 µm^2), ou 2 µg/cm^2 (132481,2 ± 57136,3 µm^2). Entretanto, a análise univariada revelou um efeito significativo sobre o Escore MCIo. A comparação *post-hoc* mostrou um prejuízo significativo sobre o Escore MCIo com P < 0,05 para as concentrações 0,2 µg/cm^2 (2,04 ± 0,71) e 2 µg/cm^2 (2,00 ± 1,10) quando comparadas com a concentração de 0 µg/cm^2 (1,39 ± 0,57) (Figura 7).

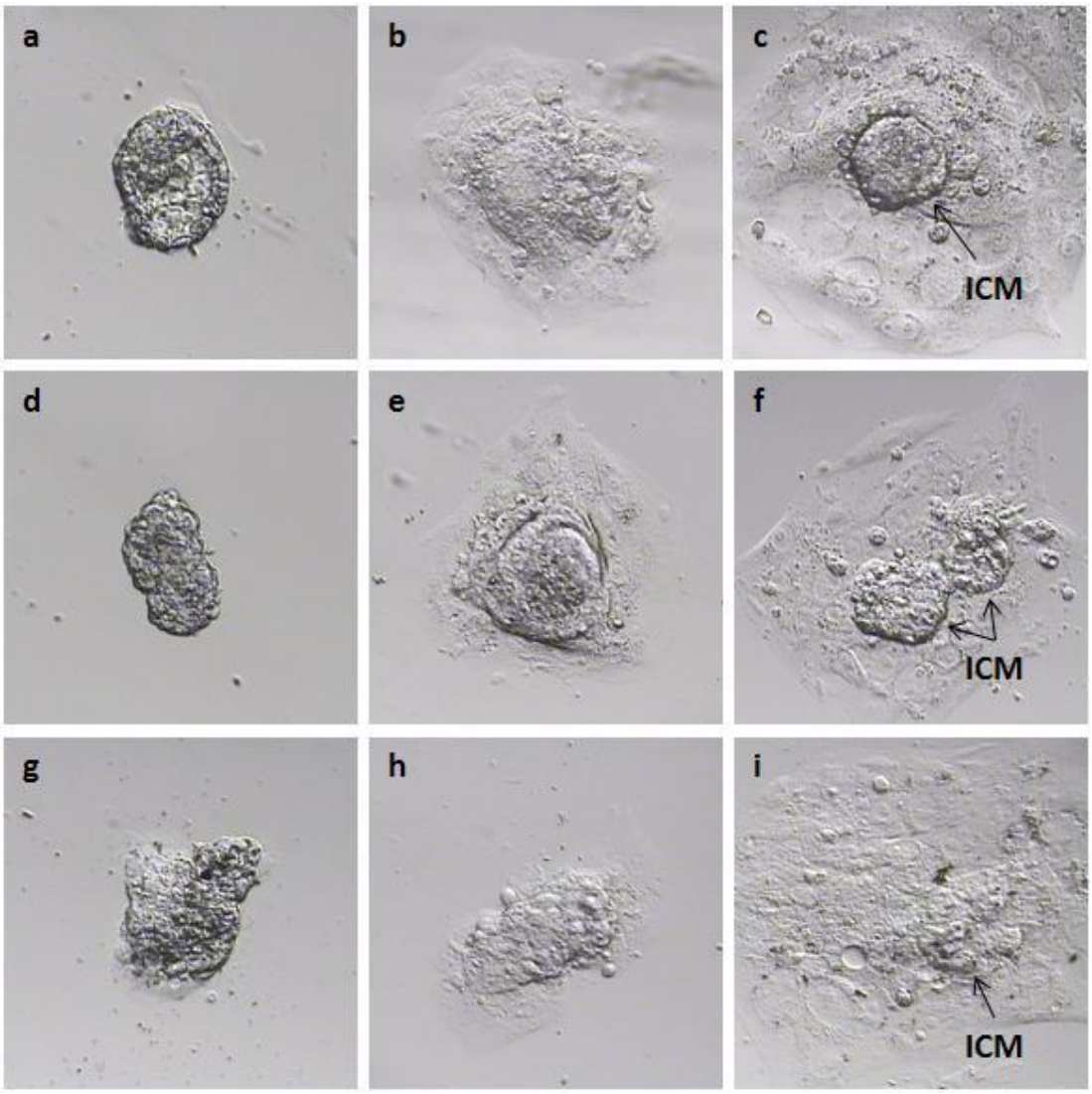

Figura 7: Fotomicrografias de contraste de modulação Hoffman da adesão do blastocisto no dia 6 (a; d; e g) e crescimento na matriz de fibronectina nos dias 7 (b; e; e h) e 8 (c; f e i). Blastocistos derivados de zigotos de camundongo expostos às distintas concentrações de PED ao longo do desenvolvimento inicial: 0 µg/cm² (a; b; e c); 0,2 µg/cm² (d; e; e f); 2 µg/cm² (g; h; e i). As setas indicam a massa celular interna (MCI) no dia 8 de desenvolvimento.

Efeitos sobre a viabilidade e apoptose celular

A exposição dos embriões às distintas concentrações de PED revelou um efeito significativo sobre a viabilidade celular dos blastocistos no dia 5 de cultivo (Pillai's trace = 0,34; F = 6,88; P = 0,000; poder = 1,000). A comparação *post-hoc* das taxas de células

apoptóticas, necróticas e dos blastocistos mostrou diferenças significativas entre os grupos. A taxa de apoptose nos blastocistos derivados de embriões expostos às concentrações de 0 µg/cm^2 e 0,2 µg/cm^2 foi significativamente menor ($P < 0,05$) que nos blastocistos derivados de embriões expostos a 2 µg/cm^2 de PED. Adicionalmente, a porcentagem de células vivas em blastocistos derivados de embriões expostos às concentrações de 0 µg/cm^2 e 0,2 µg/cm^2 foi significativamente maior ($P < 0,05$) que nos blastocistos derivados de embriões expostos à concentração de 2 µg/cm^2. Por outro lado, não houve diferença entre as taxas de necrose dos diferentes grupos de exposição (Tabela 4).

Tabela 4: Comparação dos efeitos das diferentes concentrações de partículas exauridas do diesel (PED) presentes no meio de cultivo *in vitro* sobre a viabilidade celular no estágio de blastocisto 120 hpi

Dependente Variável	Sub-grupo 1		Sub-grupo 2	
	Concentração (µg/cm^2)	Média ± DP	Concentração (µg/cm^2)	Média ± DP
Células em Apoptose	0	0,047 ± 0,04	2	0,122 ± 0,05
	0,2	0,068 ± 0,05		
Células Mortas	0	0,014 ± 0,01		
	0,2	0,018 ± 0,02		
	2	0,019 ± 0,02		
Células Vivas	0	0,939 ± 0,04	2	0,859 ± 0,05
	0,2	0,914 ± 0,05		

P<0,05, sub-grupo 1 vs. sub-grupo 2 (*post-hoc* utilizando Teste de Tukey HSD, depois de MANOVA). Concentrações de PED com valores médios de variáveis dependentes não mostrando nenhuma diferença significativa entre eles foram agrupadas em subconjuntos homogêneos

As concentrações crescentes de PED tiveram um efeito significativo sobre as taxas de células apoptóticas e vivas nos blastocistos aderidos à fibronectina no dia 8 de cultivo (Pillai's trace = 0,61; F = 14,00; P = 0,000; poder = 1,000). A taxa de apoptose foi

significativamente menor para a concentração de 0 µg/cm^2 (8,6%) quando comparada às concentrações de 0,2 µg/cm^2 (17,2%) e 2 µg/cm^2 (22,1%) (P = 0,012; P = 0,000, respectivamente).

Efeitos sobre expressão de Cdx2 e Oct4 nos blastocisto 120 hpi

A exposição *in vitro* dos zigotos às PED durante o desenvolvimento inicial, independente da concentração, afetou significativamente a expressão de *Oct4* e *Cdx2* no estágio de blastocisto (Pillai's trace = 0,22; F = 2,80; P = 0,03; poder = 0,866). A imunohistoquímica dos blastocistos derivados de embriões expostos às concentrações de 0,2 µg/cm^2 e2 µg/cm^2 com 120 hpi mostrou, não somente, uma diminuição significativa (P = 0,017; P = 0,009, respectivamente) da porcentagem de células expressando *Oct4*, mas, também, um aumento na porcentagem de células expressando *Cdx2* (P = 0,017; P = 0,009, respectivamente) quando comparada com os blastocistos derivados dos embriões expostos a 0 µg/cm^2 de PED. A comparação *post-hoc* da razão *Oct4*/*Cdx2* pelo protocolo de exposição revelou diferenças significativas entre os grupos. A razão *Oct4*/*Cdx2* nos blastocistos derivados de embriões expostos às concentrações de 0,2 µg/cm^2 e 2 µg/cm^2 foi significativamente menor (P < .05) que os blastocistos expostos à concentração de 0 µg/cm^2 de PED (Figura 8).

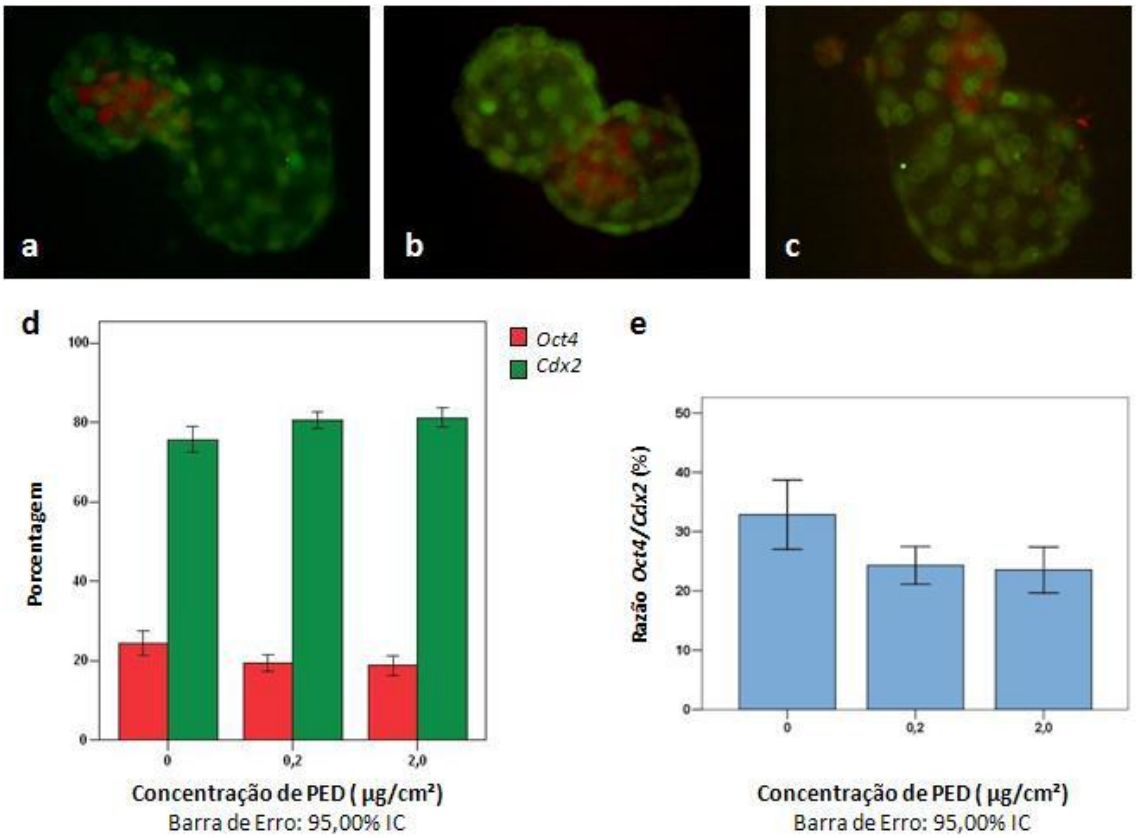

Figura 8: Expressão de *Oct4* (vermelho) e *Cdx2* (verde) em blastocistos 120 hpi de derivados de zigostos expostos a distintas concentrações de PED ao longo do desenvolvimento inicial: (a) 0 µg/cm²; (b) 0,2 µg/cm²; e (C) 2 µg/cm². As porcentagens de *Oct4* e *Cdx2* assim com a razão entre elas são mostradas em (d) e (e), respectivamente, de acordo com a concentração de PED. IC: interval de confiança.

Discussão

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que a exposição de embriões de camundongo ao meio de cultura contendo diferentes concentrações de PED tem efeitos distintos sobre a qualidade e o desenvolvimento embrionário inicial. No primeiro experimento, o potencial de desenvolvimento dos zigotos não foi afetado pelas concentrações de 0,2 $\mu g/cm^2$ ou 2 $\mu g/cm^2$, mas foi significativamente prejudicado pela concentração de 20 $\mu g/cm^2$. Na concentração de 2 $\mu g/cm^2$, embora as PED não tenham apresentado nenhum efeito sobre as taxas de formação de blastocisto em 96 e 120 horas após a inseminação, a competência do desenvolvimento dos blastocistos, avaliada como Escore D foi significativamente diminuída. Por outro lado, a avaliação morfológica da qualidade dos embriões pré-implantação através da coloração diferencial das duas linhagens celulares do blastocisto revelou que a exposição dos zigotos às PED, independente da concentração, causou alteração no padrão de segregação celular pela acentuada redução no número de células da MCI sem alterar a contagem celular total, sugerindo um desvio da especificação celular para a linhagem placentária, o que pode comprometer a viabilidade do embrião. Embora o número de células da MCI e a razão MCI/TE tenham diminuído progressivamente conforme o aumento da concentração de PED, nenhuma diferença entre os grupos foi identificada sugerindo um efeito tudo ou nada das PED sobre a especificação das linhagens celulares no estágio de blastocisto. No segundo experimento, os dados mostraram que nem a adesão ou o desenvolvimento peri-implantação dos blastocistos de camundongo em matriz de

fibronectina foram comprometidos pela exposição às PED, mas a integridade morfológica da MCI foi significativamente prejudicada. No dia 5, o aumento da morte celular por apoptose, mas não por necrose, foi encontrada apenas nos embriões expostos à concentração de 2 µg/cm^2. Entretanto, a razão de DNA marcado por TUNEL e DNA total dos embriões aderidos e expandidos em fibronectina no dia 8 foi significativamente maior em embriões expostos às concentrações de 0,2 µg/cm^2 (17,2%) e 2 µg/cm^2 (22,1%) quando comparados com a concentração de 0 µg/cm^2 (8,6%). A análise da expressão de *Oct4* e *Cdx2* em blastocistos eclodidos mostrou que tanto o número de células *Oct4* positivas e a razão entre células *Oct4* positivas e células *Cdx2* positivas foram significativamente maiores nos embriões que não foram expostos às PED. Esses resultados reforçam a idéia de que a MCI pode ser um importante alvo das PED, assim como foi demonstrado pela coloração diferencial dos blastocistos.

Em áreas metropolitanas, as PED oriundas das emissões do trânsito são provavelmente um dos maiores constituintes do material particulado fino e são consideradas a principal causa dos efeitos adversos sobre a saúde humana relacionados à poluição atmosférica[(154)]. Estudos recentes fornecem evidências de que as partículas ultrafinas, das quais das PED são o principal constituinte, podem não ficar restritas aos pulmões e atingir outros órgãos via sistema respiratório, e causar disfunções cardíacas, neuronais e reprodutivas[(155-157)]. Experimentos controlados desenvolvidos em nosso laboratório mostraram que a exposição a níveis ambientais de PED tem um significante impacto sobre a função reprodutiva feminina, afetando o

desenvolvimento embrionário pré e pós-implantação. A exposição ao $MP_{2,5}$ ambiental foi correlacionada à mudança no padrão de segregação celular das duas primeiras linhagens do blastocisto sem interferir na fertilização ou desenvolvimento embrionário inicial de camundongos[53]. O desenvolvimento embrionário pós-implantação deficiente acarretando um aumento no número de falhas implantacionais, diminuição no número de fetos viáveis, altas taxas de perdas e morte intra-uterina, também foram relatadas[48, 50]. Recentemente, um estudo epidemiológico retrospectivo confirmou o aumento do risco de perda de gravidez precoce anteriormente observado em estudos experimentais de mulheres expostas às partículas da poluição do ar. Nesse estudo, Perin *et al.* [47] demonstraram evidências de associação entre uma breve exposição a níveis elevados de material particulado durante o período pré-concepcional e perda de gravidez precoce, independentemente do método de concepção (natural ou após tratamento IVF) e revelou um aumento de 2,6 vezes no risco de aborto espontâneo.

Baseados nos achados anteriores do nosso laboratório[63] no qual foram acompanhados a fertilização e desenvolvimento embrionário depois de exposição às PED de curta duração no período pré-concepcional de fêmeas de camundongo e demonstrado que apenas a qualidade, mas não o desenvolvimento, foi especificamente afetada através da alteração do padrão de alocação das duas primeiras linhagens celulares no estágio de blastocisto, e apoiados por uma conclusão semelhante das observações clínicas anteriores, mostrando um aumento do risco de perda de gravidez precoce em vez do prejuízo ao desenvolvimento embrionário *in vitro* ou ao potencial de implantação de mulheres expostas às partículas da poluição do ar

durante o desenvolvimento folicular do ciclo de concepção[158], investigamos no presente estudo se a exposição direta dos zigotos a diferentes concentrações de PED poderia ter um efeito similar sobre o desenvolvimento embrionário e segregação celular a fim de relacioná-lo às PED. Nesse experimento, nenhum efeito sobre o potencial de desenvolvimento embrionário foi encontrado, exceto com o cultivo na maior concentração de PED. Entretanto, a qualidade embrionária, refletida como número de células na MCI e a razão MCI/TE, no primeiro experimento, e pela expressão de *Oct4* e a razão *Oct4/Cdx2* nos blastocistos 120 hpi e a integridade morfológica da MCI dos embriões peri-implantação, no segundo experimento, foram prejudicados por qualquer concentração de PED adicionada ao meio de cultivo. Esses achados suportam a idéia de que o aumento do risco de perda fetal precoce em camundongos expostos à poluição do ar pode ser atribuído às concentrações encontradas no PED do ar urbano.

A diferenciação celular embrionária em duas linhagens distintas, a MCI que dará origem a todos os tecidos embrionários e parte das membranas extra-embrionárias e as células TE que contribuem principalmente para a formação da placenta fetal, resulta na formação do blastocisto[98]. Vários fatores de transcrição têm sido identificados como os principais reguladores da formação e do destino dessas duas linhagens celulares. Um dos fatores reguladores do desenvolvimento da MCI é o *Oct4*, um fator de transcrição do domínio POU, expresso em todos os blastômeros do embrião inicial, que se torna restrito à MCI com a formação do blastocisto[98]. Embriões com ausência de *Oct4* podem implantar com sucesso, mas não se desenvolvem devido à ausência da

MCI[100]. A expressão de Oct4 em um “nível normal” parece ser fundamental para a preservação da pluripotência da MCI, uma vez que o aumento ou a diminuição da expressão de *Oct4* leva à diferenciação em celular do meso/endoderma ou TE, respectivamente, como foi demonstrado em estudos com células-tronco embrionárias[159, 160]. O *Cdx2*, outro fator de transcrição, parece desenvolver um papel importante na especificação inicial do TE e sua expressão é restrita ao TE nos embriões peri-implantação[161]. A ausência da expressão de *Cdx2* em embriões mutantes determina a perda da integridade epitelial do TE e aumento da apoptose, levando o blastocisto ao colapso e morte antes da implantação[98]. A interação adequada entre estes e outros reguladores de transcrição desempenha um papel decisivo na especificação e manutenção dessas primeiras linhagens celulares e são fundamentais para a sobrevivência do embrião.

Os fatores ambientais comumente influenciam a proliferação celular ou a apoptose no embrião e o número de células da MCI e TE em blastocistos. O desequilíbrio na diferenciação das linhagens celulares do blastocisto pode comprometer o subseqüente potencial de desenvolvimento pós-implantacional do embrião[162]. Devido às diferenças de posicionamento e exigências metabólicas, as células da MCI e TE podem ter sensibilidade diferencial aos agentes embriotóxicos, e na maioria dos casos as células da MCI parecem mais propensas a danos que as células TE[163].

Em nosso estudo, a exposição direta dos embriões às diminuiu significativamente o número de células da MCI e a razão células em 39% e 45%, 51% e 52%, e 66% e 64%, respectivamente, para as concentrações de 0,2, 2 e 20 $\mu g/cm^2$. Como mostrado por

diferentes estudos avaliando o efeito da população celular da MCI sobre o crescimento pós-implantacional *in vivo*, uma redução acentuada no número de células da MCI resulta em baixas taxas de implantação, aumento da reabsorção fetal, e diminuição do peso fetal, confirmando que o número absoluto de células na MCI é essencial para a viabilidade da gestação[164-166]. Utilizando transferência de embriões de camundongo, Tam[164] mostrou que a redução de aproximadamente 30% no número de células a MCI dos blastocistos transferidos para fêmeas de camundongo pseudo-prenhes foi associada com um maior risco de perda precoce da gestação e menor potencial de desenvolvimento embrionário. Neste estudo, observamos que a menor concentração de PED causou uma diminuição de 39% no número de células da MCI, sugerindo uma possível razão para o aumento de perda precoce observado em camundongos expostos à poluição atmosférica.

Embora o mecanismo pelo qual exposição às DEP pode determinar a segregação anormal das linhagens celulares no estágio de blastocisto do desenvolvimento embrionário seja ainda desconhecido, existem algumas possibilidades sobre as quais podemos especular. Nossos dados mostraram uma diminuição significativa no número de células expressando *Oct4* a na razão *Oct4/Cdx2* em 24% e 26%, e 28% e 30%, respectivamente, para os embriões exposta às concentrações de PED de 0,2 µg/cm² e 2 µg/cm², sem nenhuma diferença no número de células expressando *Cdx2* entre os diferentes grupos de exposição. O antagonismo mútuo entre *Oct4* e *Cdx2* reforça a segregação celular entre a MCI e TE no blastocisto[98]. A redução da expressão de *Oct4* prejudica a formação de uma MCI adequada capaz de se diferenciar entre as linhagens

embrionárias, e leva ao aumento da expressão de *Cdx2*, restringindo as células à diferenciação ao longo da linhagem do trofoblasto extra-embrionário[167]. No presente estudo, a expressão diminuída de *Oct4* pode ser associada com a redução significativa no número de células da MCI apresentada pelos embriões expostos às PED. Esse efeito pode acarretar a perda da inibição recíproca entre os fatores de transcrição linhagem-específicos (*Oct4* e *Cdx2*) envolvidos na segregação das duas primeiras linhagens celulares do embrião. A superexpressão de *Cdx2* resultante poderia direcionar a diferenciação das células para o TE, podendo refletir um potencial mecanismo compensatório através do qual o número total de células dos blastocistos expostos às PED é mantido. Esses achados podem fornecer um mecanismo de explicação não apenas para o potencial de implantação não afetado observado pelo teste de adesão e crescimento trofoblástico *in vitro*, mas também para a redução da viabilidade embrionária devido à perda celular e da integridade morfológica da MCI. O aumento da apoptose causado até pela menor concentração de PED, levando à perda de aproximadamente 20% das células dos blastocistos no dia 8 de cultivo observada nesse estudo, também pode estar correlacionado à morte embrionária durante a implantação e, portanto, influenciar negativamente a viabilidade da gravidez em camundongos e mulheres expostos à poluição atmosférica. Embora o processo de morte celular programada seja crucial para o desenvolvimento embrionário, por regular a estruturação do embrião/feto e eliminar células anormais, o desbalanço na taxa de apoptose celular pode resultar em conseqüências desastrosas no desenvolvimento embrionário[168]. Apoptose pode resultar da exposição da HPA,

componentes orgânicos das PED, através do aumento da expressão do gene pró-apoptótico *Bax*, induzindo à morte celular. Detmar *et al.*[169] mostrou em um estudo recente que a exposição de embriões em seus estágios iniciais a HPA reduz a alocação de células para as linhagens embrionária e placentária através da indução de apoptose *Bax*-dependente, comprometendo o potencial de desenvolvimento dos embriões expostos e levando a uma elevada taxa de perda embrionária.

Mesmo que a alteração da segregação das linhagens de celulares na fase de blastocisto observada após a exposição direta do embrião às PED possa ser apontada como possível mecanismo pelo qual as PED afetariam negativamente a viabilidade da gravidez, nós reconhecemos algumas limitações do nosso estudo. Estamos conscientes de que uma análise cuidadosa das relações dose-resposta é fundamental para uma avaliação toxicológica. Isso inclui não apenas perguntas sobre as propriedades estruturais de partículas do diesel, mas, o mais importante, a relevância dos níveis ambientais das PED. A observação, no presente estudo, de efeitos *in vitro* sobre o desenvolvimento embrionário e segregação das linhagens celulares na fase de blastocisto em concentrações muito altas PED (20 $\mu g/cm^2$) são improváveis de serem encontradas *in vivo*. No entanto, a observação de alterações na alocação celular, expressão de fatores de transcrição determinantes ao desenvolvimento no estágio de blastocisto e na taxa de apoptose celular do embrião em fases distintas do desenvolvimento na concentração mais baixa de PED (0,2 $\mu g/cm^2$) se ajusta dentro de um cenário realista de exposição *in vivo*, como anteriormente demonstrado por Li *et al.*[170]. Nesse estudo, demonstraram por avaliações de dosimetria de deposição de MP

em um adulto exposto que, doses *in vitro* de 0,2–20 µg/cm^2 podem ser alcançadas ao longo de um período de 24 h de exposição. Embora tenhamos observado que as PED afetam o embrião, não pudemos determinar qual de seus componentes foi associada aos efeitos observados. Extrações consecutivas com ácido, metanol e hexano devem ser realizadas para remover compostos adsorvidos à superfície (orgânicos e metálicos) presentes na PED para testar os efeitos individuais dessas frações sobre os parâmetros avaliados. Finalmente, os efeitos observados neste estudo sobre a primeira alocação celular e qualidade do embrião podem estar subestimados devido à cultura dos zigotos em meio de cultura suplementado com ácido etileno-di-amino-tetra-acético (EDTA) e albumina humana, pois atuam como quelantes de íons de metais de transição e, portanto, impedem a geração extracelular de radicais de oxigênio[171].

À luz dos nossos resultados, podemos presumir que o aumento do risco de perda precoce da gravidez observado em camundongos expostos à poluição do ar pode ser ligado às PED. Os dados encontrados neste estudo sugerem que a alteração na segregação das linhagens celulares do blastocisto, identificada através da acentuada redução da população celular da MCI, causada pela exposição às PED com nenhum efeito sobre o desenvolvimento embrionário pode ajudar a explicar esse risco aumentado. Entretanto, o mecanismo causal relacionando o comprometimento da viabilidade do embrião e a sobrevivência fetal com o desequilíbrio entre o número de células expressando *Oct4*/*Cdx2* e a perda da integridade morfológica da MCI, provavelmente resultante de dano oxidativo do DNA e apoptose, precisa de mais esclarecimentos. Estudos translacionais são necessários para investigar este efeito em

seres humanos uma vez que estas observações têm um impacto importante sobre a saúde reprodutiva das mulheres que vivem nas grandes áreas urbanas que estão sujeitas à poluição do ar episódica.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

Com base em nossos achados, concluímos que a exposição às partículas de exaustão do diesel durante o desenvolvimento inicial *in vitro* afeta o desenvolvimento e a qualidade de embriões de camundongos, pois:

a. É capaz de alterar as taxas de formação de blastocisto em dose elevada (20 µg/cm²);
b. Afeta o padrão de eclosão dos blastocistos;
c. Altera a alocação de células entre MCI e TE dos embriões expostos, sem alterar o número total de células;
d. Prejudica a integridade morfológica da MCI dos blastocistos 120 hpi;
e. Não afeta o potencial de implantação dos embriões, pois não altera a capacidade de adesão do blastocisto e crescimento do trofoblasto em matriz extracelular definida de fibronectina;
f. Prejudica a integridade morfológica da MCI dos embriões aderidos à fibronectina;
g. Diminui a taxa de células vivas e aumenta a taxa de células em apoptose dos blastocistos 120hpi;
h. Diminui a taxa de células vivas e eleva a taxa de células apoptóticas dos embriões aderidos à MEC de fibronectina;
i. Altera as taxas de expressão dos fatores Oct4 e Cdx2 nos blastocistos, bem como, diminui a razão de expressão Oct4/Cdx2.

Referências

REFERÊNCIAS

1. Daar A, Merali Z. Infertility and social suffering: the case of ART in developing countries. In: Vayena E, Rowe P, Griffin P, editors. Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a WHO meeting. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2002. p. 15-21.
2. CONAMA. Resolução nº 003. Brasil: CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE 1990.
3. CETESB. Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo 2008. São Paulo: Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Secretaria de Estado do Meio Ambiente do Governo do Estado de São Paulo; 2009. p. 340.
4. Hinds W, editor. Aerosol Techonology: Properties, Behaviour, and Measurement of Airborne Particles. 2nd ed. New York: Wiley-Interscience; 1999.
5. Cadle SH, Mulawa PH, Ball J, Donase C, Weibel A, Sagebiel JC, et al. Particulate Emission Rates from In-Use High-Emitting Vehicles Recruited in Orange County, California. Environ Sci Technol. 1997;31(12):3405–12.
6. Braun S, Appel LG, Schmal M. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas à diesel - a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. Quim Nova. 2003;27(3):472-82.
7. Schuetzle D. Sampling of vehicle emissions for chemical analysis and biological testing. Environ Health Perspect. 1983 Jan;47:65-80.
8. Schuetzle D, Lewtas J. Bioassay-directed chemical analysis in environmental research. Anal Chem. 1986 Sep;58(11):1060A-75A.
9. Bayona JM, Barcelo D, Albaiges J. Characterization of polar substituted polycyclic aromatic compounds using high-resolution gas chromatography/mass spectrometry negative ion chemical ionization and positive and negative ion thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. Biomed Environ Mass Spectrom. 1988 Oct;16(1-12):461-7.
10. Nel A. Atmosphere. Air pollution-related illness: effects of particles. Science. 2005 May 6;308(5723):804-6.
11. Hansen CS, Sheykhzade M, Moller P, Folkmann JK, Amtorp O, Jonassen T, et al. Diesel exhaust particles induce endothelial dysfunction in apoE-/- mice. Toxicol Appl Pharmacol. 2007 Feb 15;219(1):24-32.
12. Danielsen PH, Loft S, Moller P. DNA damage and cytotoxicity in type II lung epithelial (A549) cell cultures after exposure to diesel exhaust and urban street particles. Part Fibre Toxicol. 2008;5:6.
13. Kumagai Y, Koide S, Taguchi K, Endo A, Nakai Y, Yoshikawa T, et al. Oxidation of proximal protein sulfhydryls by phenanthraquinone, a component of diesel exhaust particles. Chem Res Toxicol. 2002 Apr;15(4):483-9.
14. Bayram H, Ito K, Issa R, Ito M, Sukkar M, Chung KF. Regulation of human lung epithelial cell numbers by diesel exhaust particles. Eur Respir J. 2006 Apr;27(4):705-13.
15. Pan CJ, Schmitz DA, Cho AK, Froines J, Fukuto JM. Inherent redox properties of diesel exhaust particles: catalysis of the generation of reactive oxygen species by biological reductants. Toxicol Sci. 2004 Sep;81(1):225-32.
16. Ohyama M, Otake T, Adachi S, Kobayashi T, Morinaga K. A comparison of the production of reactive oxygen species by suspended particulate matter and diesel exhaust particles with macrophages. Inhal Toxicol. 2007;19 Suppl 1:157-60.

17. Ming-Ho Y. Environmental toxicology: impacts of environmental toxicants on living systems Boca Raton, Florida: CRC Press LLC; 2001.
18. Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, et al. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. Am J Respir Crit Care Med. 2002 Jun 15;165(12):1610-7.
19. Gauderman WJ, Avol E, Gilliland F, Vora H, Thomas D, Berhane K, et al. The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. N Engl J Med. 2004 Sep 9;351(11):1057-67.
20. Pope CA, 3rd. Air pollution and health - good news and bad. N Engl J Med. 2004 Sep 9;351(11):1132-4.
21. Pope CA, 3rd. Particulate matter-mortality exposure-response relations and threshold. Am J Epidemiol. 2000 Sep 1;152(5):407-12.
22. Braga AL, Saldiva PH, Pereira LA, Menezes JJ, Conceicao GM, Lin CA, et al. Health effects of air pollution exposure on children and adolescents in Sao Paulo, Brazil. Pediatr Pulmonol. 2001 Feb;31(2):106-13.
23. Bartra J, Mullol J, del Cuvillo A, Davila I, Ferrer M, Jauregui I, et al. Air pollution and allergens. J Investig Allergol Clin Immunol. 2007;17 Suppl 2:3-8.
24. Ciencewicki J, Jaspers I. Air pollution and respiratory viral infection. Inhal Toxicol. 2007 Nov;19(14):1135-46.
25. Dubowsky SD, Suh H, Schwartz J, Coull BA, Gold DR. Diabetes, obesity, and hypertension may enhance associations between air pollution and markers of systemic inflammation. Environ Health Perspect. 2006 Jul;114(7):992-8.
26. Saldiva PH, Pope CA, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, et al. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. Arch Environ Health. 1995 Mar-Apr;50(2):159-63.
27. Barnett AG, Williams GM, Schwartz J, Neller AH, Best TL, Petroeschevsky AL, et al. Air pollution and child respiratory health: a case-crossover study in Australia and New Zealand. Am J Respir Crit Care Med. 2005 Jun 1;171(11):1272-8.
28. Lee BE, Ha EH, Park HS, Kim YJ, Hong YC, Kim H, et al. Exposure to air pollution during different gestational phases contributes to risks of low birth weight. Hum Reprod. 2003 Mar;18(3):638-43.
29. Pereira LA, Loomis D, Conceicao GM, Braga AL, Arcas RM, Kishi HS, et al. Association between air pollution and intrauterine mortality in Sao Paulo, Brazil. Environ Health Perspect. 1998 Jun;106(6):325-9.
30. Sram RJ, Binkova B, Dejmek J, Bobak M. Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature. Environ Health Perspect. 2005 Apr;113(4):375-82.
31. Maisonet M, Correa A, Misra D, Jaakkola JJ. A review of the literature on the effects of ambient air pollution on fetal growth. Environ Res. 2004 May;95(1):106-15.
32. Adamopoulos DA, Pappa A, Nicopoulou S, Andreou E, Karamertzanis M, Michopoulos J, et al. Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the greater Athens area during the period 1977-1993. Hum Reprod. 1996 Sep;11(9):1936-41.
33. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. BMJ. 1992 Sep 12;305(6854):609-13.
34. Perreault SD, Rubes J, Robbins WA, Evenson DP, Selevan SG. Evaluation of aneuploidy and DNA damage in human spermatozoa: applications in field studies. Andrologia. 2000 Sep;32(4-5):247-54.

35. Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, Zudova Z, Rubes J, Evenson DP, et al. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. Environ Health Perspect. 2000 Sep;108(9):887-94.
36. Rubes J, Selevan SG, Evenson DP, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, et al. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. Hum Reprod. 2005 Oct;20(10):2776-83.
37. Lin MH, Kuo-Kuang Lee R, Li SH, Lu CH, Sun FJ, Hwu YM. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. Fertil Steril. 2008 Aug;90(2):352-9.
38. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu MA, Fava L, Flamigni C, et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. Hum Reprod. 2006 Nov;21(11):2876-81.
39. Bobak M, Leon DA. Air pollution and infant mortality in the Czech Republic, 1986-88. Lancet. 1992 Oct 24;340(8826):1010-4.
40. Bobak M. Outdoor air pollution, low birth weight, and prematurity. Environ Health Perspect. 2000 Feb;108(2):173-6.
41. Wang X, Ding H, Ryan L, Xu X. Association between air pollution and low birth weight: a community-based study. Environ Health Perspect. 1997 May;105(5):514-20.
42. Maisonet M, Bush TJ, Correa A, Jaakkola JJ. Relation between ambient air pollution and low birth weight in the Northeastern United States. Environ Health Perspect. 2001 Jun;109 Suppl 3:351-6.
43. Dejmek J, Selevan SG, Benes I, Solansky I, Sram RJ. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. Environ Health Perspect. 1999 Jun;107(6):475-80.
44. Dejmek J, Solansky I, Benes I, Lenicek J, Sram RJ. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. Environ Health Perspect. 2000 Dec;108(12):1159-64.
45. Lin CA, Pereira LA, Nishioka DC, Conceicao GM, Braga AL, Saldiva PH. Air pollution and neonatal deaths in Sao Paulo, Brazil. Braz J Med Biol Res. 2004 May;37(5):765-70.
46. Gouveia N, Bremner SA, Novaes HM. Association between ambient air pollution and birth weight in Sao Paulo, Brazil. J Epidemiol Community Health. 2004 Jan;58(1):11-7.
47. Perin PM, Maluf M, Czeresnia CE, Nicolosi Foltran Januario DA, Nascimento Saldiva PH. Effects of exposure to high levels of particulate air pollution during the follicular phase of the conception cycle on pregnancy outcome in couples undergoing in vitro fertilization and embryo transfer. Fertil Steril. 2009 Jul 22.
48. Mohallem SV, de Araujo Lobo DJ, Pesquero CR, Assuncao JV, de Andre PA, Saldiva PH, et al. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. Environ Res. 2005 Jun;98(2):196-202.
49. Lichtenfels AJ, Gomes JB, Pieri PC, El Khouri Miraglia SG, Hallak J, Saldiva PH. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in Sao Paulo, Brazil. Fertil Steril. 2007 Jan;87(1):230-2.
50. Rocha ESIR, Lichtenfels AJ, Amador Pereira LA, Saldiva PH. Effects of ambient levels of air pollution generated by traffic on birth and placental weights in mice. Fertil Steril. 2008 Nov;90(5):1921-4.
51. Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Maciel Ribeiro AA, Mayhew TM, Saldiva PH, et al. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. Biol Reprod. 2008 Sep;79(3):578-84.

52. Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Guimaraes Silva RM, Scoriza JN, Saldiva PH, Caldini EG, et al. Chronic exposure to fine particulate matter emitted by traffic affects reproductive and fetal outcomes in mice. Environ Res. 2009 Jul;109(5):536-43.
53. Maluf M, Perin PM, Foltran Januario DA, Nascimento Saldiva PH. In vitro fertilization, embryo development, and cell lineage segregation after pre- and/or postnatal exposure of female mice to ambient fine particulate matter. Fertil Steril. 2009 Nov;92(5):1725-35.
54. Izawa H, Kohara M, Watanabe G, Taya K, Sagai M. Diesel exhaust particle toxicity on spermatogenesis in the mouse is aryl hydrocarbon receptor dependent. J Reprod Dev. 2007 Oct;53(5):1069-78.
55. Yoshida S, Sagai M, Oshio S, Umeda T, Ihara T, Sugamata M, et al. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. Int J Androl. 1999 Oct;22(5):307-15.
56. Tsukue N, Tsubone H, Suzuki AK. Diesel exhaust affects the abnormal delivery in pregnant mice and the growth of their young. Inhal Toxicol. 2002 Jun;14(6):635-51.
57. Reliene R, Hlavacova A, Mahadevan B, Baird WM, Schiestl RH. Diesel exhaust particles cause increased levels of DNA deletions after transplacental exposure in mice. Mutat Res. 2005 Mar 1;570(2):245-52.
58. Fujimoto A, Tsukue N, Watanabe M, Sugawara I, Yanagisawa R, Takano H, et al. Diesel exhaust affects immunological action in the placentas of mice. Environ Toxicol. 2005 Aug;20(4):431-40.
59. Furuta C, Suzuki AK, Taneda S, Kamata K, Hayashi H, Mori Y, et al. Estrogenic activities of nitrophenols in diesel exhaust particles. Biol Reprod. 2004 May;70(5):1527-33.
60. Hougaard KS, Jensen KA, Nordly P, Taxvig C, Vogel U, Saber AT, et al. Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice. Part Fibre Toxicol. 2008;5:3.
61. Watanabe N, Ohsawa M. Elevated serum immunoglobulin E to Cryptomeria japonica pollen in rats exposed to diesel exhaust during fetal and neonatal periods. BMC Pregnancy Childbirth. 2002 Mar 25;2(1):2.
62. Yoshida S, Yoshida M, Sugawara I, Takeda K. Mice strain differences in effects of fetal exposure to diesel exhaust gas on male gonadal differentiation. Environ Sci. 2006;13(2):117-23.
63. Perin P, Maluf M, Januario D, Saldiva P. Effects of short-term exposure of female mice to diesel exhaust particles on in vitro fertilization and embryo development. Fertil Steril. 2008;90(Suppl1):S206.
64. Rothman KJ, Greenland S. Types of Epidemiological Studies. Modern epidemiology. 2nd ed. Washington: Lippincott Williams & Wilkins; 1998. p. 67-78.
65. André PA. Câmara de topo aberto, CTA: construção e uso para observação de potencial tóxico da poluição atmosférica urbana com bioensaios em plantas. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2007.
66. Woodruff TJ, Parker JD, Darrow LA, Slama R, Bell ML, Choi H, et al. Methodological issues in studies of air pollution and reproductive health. Environ Res. 2009 Apr;109(3):311-20.
67. Sioutas C, Koutrakis P, Burton RM. A technique to expose animals to concentrated fine ambient aerosols. Environ Health Perspect. 1995 Feb;103(2):172-7.
68. Godleski JJ, Verrier RL, Koutrakis P, Catalano P, Coull B, Reinisch U, et al. Mechanisms of morbidity and mortality from exposure to ambient air particles. Res Rep Health Eff Inst. 2000 Feb(91):5-88; discussion 9-103.

69. Saldiva PH, King M, Delmonte VL, Macchione M, Parada MA, Daliberto ML, et al. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. Environ Res. 1992 Feb;57(1):19-33.
70. Akinaga LM, Lichtenfels AJ, Carvalho-Oliveira R, Caldini EG, Dolhnikoff M, Silva LF, et al. Effects of chronic exposure to air pollution from Sao Paulo city on coronary of Swiss mice, from birth to adulthood. Toxicol Pathol. 2009;37(3):306-14.
71. Mauad T, Rivero DH, de Oliveira RC, Lichtenfels AJ, Guimaraes ET, de Andre PA, et al. Chronic exposure to ambient levels of urban particles affects mouse lung development. Am J Respir Crit Care Med. 2008 Oct 1;178(7):721-8.
72. Watanabe N, Kurita M. The masculinization of the fetus during pregnancy due to inhalation of diesel exhaust. Environ Health Perspect. 2001 Feb;109(2):111-9.
73. Liu S, Krewski D, Shi Y, Chen Y, Burnett R. Association between gaseous ambient air pollutants and adverse pregnancy outcomes in Vancouver, Canada. Environ Health Perspect. 2003;111(14):1773-8.
74. Li C, Taneda S, Taya K, Watanabe G, Li X, Fujitani Y, et al. Effects of in utero exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular function in immature male rats. Toxicol Lett. 2009 Feb 25;185(1):1-8.
75. Seagrave J, McDonald JD, Gigliotti AP, Nikula KJ, Seilkop SK, Gurevich M, et al. Mutagenicity and in vivo toxicity of combined particulate and semivolatile organic fractions of gasoline and diesel engine emissions. Toxicol Sci. 2002 Dec;70(2):212-26.
76. Carvalho-Oliveira R, Saiki M, Pires-Neto RC, Lorenzi-Filho G, Macchione M, Saldiva PH. Anti-oxidants reduce the acute adverse effects of residual oil fly ash on the frog palate mucociliary epithelium. Environ Res. 2005 Jul;98(3):349-54.
77. Rivero DH, Soares SR, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, et al. Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of Sao Paulo, Brazil. Toxicol Sci. 2005 Jun;85(2):898-905.
78. Yokota S, Seki T, Naito Y, Tachibana S, Hirabayashi N, Nakasaka T, et al. Tracheal instillation of diesel exhaust particles component causes blood and pulmonary neutrophilia and enhances myocardial oxidative stress in mice. J Toxicol Sci. 2008 Dec;33(5):609-20.
79. Maatz LF, Wood GJ, Rivero DH, Saldiva PH. Tracheal instillation of urban PM(2.5) suspension promotes acute cardiac polarization changes in rats. Braz J Med Biol Res. 2009 Feb;42(2):207-13.
80. Andreoli C, Gigante D, Nunziata A. A review of in vitro methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. Toxicol In Vitro. 2003 Oct-Dec;17(5-6):587-94.
81. Eisenbrand G, Pool-Zobel B, Baker V, Balls M, Blaauboer BJ, Boobis A, et al. Methods of in vitro toxicology. Food Chem Toxicol. 2002 Feb-Mar;40(2-3):193-236.
82. Gong KW, Zhao W, Li N, Barajas B, Kleinman M, Sioutas C, et al. Air-pollutant chemicals and oxidized lipids exhibit genome-wide synergistic effects on endothelial cells. Genome Biol. 2007;8(7):R149.
83. Moller W, Brown DM, Kreyling WG, Stone V. Ultrafine particles cause cytoskeletal dysfunctions in macrophages: role of intracellular calcium. Part Fibre Toxicol. 2005 Oct 4;2:7.
84. Helfenstein M, Miragoli M, Rohr S, Muller L, Wick P, Mohr M, et al. Effects of combustion-derived ultrafine particles and manufactured nanoparticles on heart cells in vitro. Toxicology. 2008 Nov 20;253(1-3):70-8.

85. Okayama Y, Kuwahara M, Suzuki AK, Tsubone H. Role of reactive oxygen species on diesel exhaust particle-induced cytotoxicity in rat cardiac myocytes. J Toxicol Environ Health A. 2006 Sep;69(18):1699-710.
86. Komatsu T, Tabata M, Kubo-Irie M, Shimizu T, Suzuki K, Nihei Y, et al. The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro. Toxicol In Vitro. 2008 Dec;22(8):1825-31.
87. Mi Y, Zhang C, Li C, Taneda S, Watanabe G, Suzuki AK, et al. Quercetin protects embryonic chicken spermatogonial cells from oxidative damage intoxicated with 3-methyl-4-nitrophenol in primary culture. Toxicol Lett. 2009 Oct 8;190(1):61-5.
88. Van Soom A, Vandaele L, Goossens K, de Kruif A, Peelman L. Gamete origin in relation to early embryo development. Theriogenology. 2007 Sep 1;68 Suppl 1:S131-7.
89. Evans JP. The molecular basis of sperm-oocyte membrane interactions during mammalian fertilization. Hum Reprod Update. 2002 Jul-Aug;8(4):297-311.
90. Minami N, Suzuki T, Tsukamoto S. Zygotic gene activation and maternal factors in mammals. J Reprod Dev. 2007 Aug;53(4):707-15.
91. Huerta Zepeda A, Torres Padilla ME, Guerra Lopez R. [Description of biological elements involved in new organism beginning. Review of contemporary investigations about early embryonary development]. Ginecol Obstet Mex. 2008 Jan;76(1):52-64.
92. Elder K, Dale B, editors. In Vitro Fertilization. 2nd ed. New York: Cambridge University Press; 2000.
93. Hamatani T, Ko M, Yamada M, Kuji N, Mizusawa Y, Shoji M, et al. Global gene expression profiling of preimplantation embryos. Hum Cell. 2006 Aug;19(3):98-117.
94. Rossant J, Tam PP. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. Development. 2009 Mar;136(5):701-13.
95. Torres-Padilla ME. Cell identity in the preimplantation mammalian embryo: an epigenetic perspective from the mouse. Hum Reprod. 2008 Jun;23(6):1246-52.
96. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, et al. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. Cell. 2005 Dec 2;123(5):917-29.
97. Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, et al. Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. Development. 2005 May;132(9):2093-102.
98. Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson RO, Rossant J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. Dev Dyn. 2006 Sep;235(9):2301-14.
99. Palmieri SL, Peter W, Hess H, Scholer HR. Oct-4 transcription factor is differentially expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. Dev Biol. 1994 Nov;166(1):259-67.
100. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. Cell. 1998 Oct 30;95(3):379-91.
101. Tesarik J, Greco E. The probability of abnormal preimplantation development can be predicted by a single static observation on pronuclear stage morphology. Hum Reprod. 1999 May;14(5):1318-23.
102. Montag M, van der Ven H. Evaluation of pronuclear morphology as the only selection criterion for further embryo culture and transfer: results of a prospective multicentre study. Hum Reprod. 2001 Nov;16(11):2384-9.

103. Balaban B, Yakin K, Urman B, Isiklar A, Tesarik J. Pronuclear morphology predicts embryo development and chromosome constitution. Reprod Biomed Online. 2004 Jun;8(6):695-700.
104. Alikani M, Cohen J, Tomkin G, Garrisi GJ, Mack C, Scott RT. Human embryo fragmentation in vitro and its implications for pregnancy and implantation. Fertil Steril. 1999 May;71(5):836-42.
105. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerssche M, Ryckaert G, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. Hum Reprod. 1999 Sep;14(9):2345-9.
106. Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. Hum Reprod. 2001 Feb;16(2):313-8.
107. Balaban B, Urman B. Embryo culture as a diagnostic tool. Reprod Biomed Online. 2003 Dec;7(6):671-82.
108. Gardner DK, Schoolcraft WB. Culture and transfer of human blastocysts. Curr Opin Obstet Gynecol. 1999 Jun;11(3):307-11.
109. Gardner DK, Lane M, Stevens J, Schlenker T, Schoolcraft WB. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. Fertil Steril. 2000 Jun;73(6):1155-8.
110. Balaban B, Yakin K, Urman B. Randomized comparison of two different blastocyst grading systems. Fertil Steril. 2006 Mar;85(3):559-63.
111. Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. Reprod Biomed Online. 2001;3(1):25-9.
112. Perin PM, Maluf M, Nicolosi Foltran Januario DA, Nascimento Saldiva PH. Comparison of the efficacy of two commercially available media for culturing one-cell embryos in the in vitro fertilization mouse model. Fertil Steril. 2008 Oct;90(4 Suppl):1503-10.
113. Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion. Fertil Steril. 2008 Nov;90(5 Suppl):S136-43.
114. Betts DH, Madan P. Permanent embryo arrest: molecular and cellular concepts. Mol Hum Reprod. 2008 Aug;14(8):445-53.
115. Li SS, Liu YH, Tseng CN, Singh S. Analysis of gene expression in single human oocytes and preimplantation embryos. Biochem Biophys Res Commun. 2006 Feb 3;340(1):48-53.
116. Vergouw CG, Botros LL, Roos P, Lens JW, Schats R, Hompes PG, et al. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. Hum Reprod. 2008 Jul;23(7):1499-504.
117. Lessey BA. Adhesion molecules and implantation. J Reprod Immunol. 2002 May-Jun;55(1-2):101-12.
118. Weitlauf HM. The Physiology of reproduction. New York: The Physiology of reproduction; 1994.
119. Guillomot M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. J Reprod Fertil Suppl. 1995;49:39-51.
120. Daftary GS, Taylor HS. Molecular markers of implantation: clinical implications. Curr Opin Obstet Gynecol. 2001 Jun;13(3):269-74.
121. Yoshinaga K. Receptor concept in implantation research. Prog Clin Biol Res. 1989;294:379-87.
122. Sharkey AM, Smith SK. The endometrium as a cause of implantation failure. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol. 2003 Apr;17(2):289-307.

123. Staun-Ram E, Shalev E. Human trophoblast function during the implantation process. Reprod Biol Endocrinol. 2005;3:56.
124. Reddy KV, Mangale SS. Integrin receptors: the dynamic modulators of endometrial function. Tissue Cell. 2003 Aug;35(4):260-73.
125. Pampfer S, Wuu YD, Vanderheyden I, De Hertogh R. In vitro study of the carry-over effect associated with early diabetic embryopathy in the rat. Diabetologia. 1994 Sep;37(9):855-62.
126. Leunda-Casi A, De Hertogh R, Pampfer S. Decreased expression of fibroblast growth factor-4 and associated dysregulation of trophoblast differentiation in mouse blastocysts exposed to high D-glucose in vitro. Diabetologia. 2001 Oct;44(10):1318-25.
127. Tan Y, Tan D, He M, Gu M, Wang Z, Zeng G, et al. A model for implantation: coculture of blastocysts and uterine endometrium in mice. Biol Reprod. 2005 Mar;72(3):556-61.
128. Mattison DR, Nightingale MS, Shiromizu K. Effects of toxic substances on female reproduction. Environ Health Perspect. 1983 Feb;48:43-52.
129. McLachlan JA, Arnold SF. Environmental estrogens. Am Sci. 1996;84:452-61.
130. Reutman SR, LeMasters GK, Knecht EA, Shukla R, Lockey JE, Burroughs GE, et al. Evidence of reproductive endocrine effects in women with occupational fuel and solvent exposures. Environ Health Perspect. 2002 Aug;110(8):805-11.
131. Hoyer PB. Can the clock be turned back on ovarian aging? Sci Aging Knowledge Environ. 2004 Mar 10;2004(10):pe11.
132. Sims P, Grover PL. Epoxides in polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and carcinogenesis. Adv Cancer Res. 1974;20:165-274.
133. Mattison DR. The mechanisms of action of reproductive toxins. Am J Ind Med. 1983;4(1-2):65-79.
134. Van Blerkom J, Davis P, Alexander S. Differential mitochondrial distribution in human pronuclear embryos leads to disproportionate inheritance between blastomeres: relationship to microtubular organization, ATP content and competence. Hum Reprod. 2000 Dec;15(12):2621-33.
135. Van Blerkom J. Mitochondria in human oogenesis and preimplantation embryogenesis: engines of metabolism, ionic regulation and developmental competence. Reproduction. 2004 Sep;128(3):269-80.
136. Somers CM, Yauk CL, White PA, Parfett CL, Quinn JS. Air pollution induces heritable DNA mutations. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Dec 10;99(25):15904-7.
137. Somers CM, McCarry BE, Malek F, Quinn JS. Reduction of particulate air pollution lowers the risk of heritable mutations in mice. Science. 2004 May 14;304(5673):1008-10.
138. Yauk C, Polyzos A, Rowan-Carroll A, Somers CM, Godschalk RW, Van Schooten FJ, et al. Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 Jan 15;105(2):605-10.
139. Yamazaki H, Hatanaka N, Kizu R, Hayakawa K, Shimada N, Guengerich FP, et al. Bioactivation of diesel exhaust particle extracts and their major nitrated polycyclic aromatic hydrocarbon components, 1-nitropyrene and dinitropyrenes, by human cytochromes P450 1A1, 1A2, and 1B1. Mutat Res. 2000 Dec 20;472(1-2):129-38.
140. Matikainen T, Perez GI, Jurisicova A, Pru JK, Schlezinger JJ, Ryu HY, et al. Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. Nat Genet. 2001 Aug;28(4):355-60.

141. Terranova PF, Rozman KK. Ovarian toxicity caused by endocrine disruptors. In: Hoyer PB, editor. Ovarian Toxicology. Boca Raton, Florida: CRC Press; 2004. p. 17-39.
142. Morse DC, Wehler EK, Wesseling W, Koeman JH, Brouwer A. Alterations in rat brain thyroid hormone status following pre- and postnatal exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254). Toxicol Appl Pharmacol. 1996 Feb;136(2):269-79.
143. Cohen J, Gilligan A, Esposito W, Schimmel T, Dale B. Ambient air and its potential effects on conception in vitro. Hum Reprod. 1997 Aug;12(8):1742-9.
144. Hall J, Gilligan A, Schimmel T, Cecchi M, Cohen J. The origin, effects and control of air pollution in laboratories used for human embryo culture. Hum Reprod. 1998 Dec;13 Suppl 4:146-55.
145. Boone WR, Johnson JE, Locke AJ, Crane MMt, Price TM. Control of air quality in an assisted reproductive technology laboratory. Fertil Steril. 1999 Jan;71(1):150-4.
146. Laboratory animal welfare; U.S. government principles for the utilization and care of vertebrate animals used in testing, research and training; notice. Fed Regist. 1985 May 20;50(97):20864-5.
147. Oberdorster G, Yu CP. Lung dosimetry--considerations for noninhalation studies. Exp Lung Res. 1999 Jan-Feb;25(1):1-6.
148. Gardner DK, Lane M. Towards a single embryo transfer. Reprod Biomed Online. 2003 Jun;6(4):470-81.
149. Fraser RB, Waite SL, Wood KA, Martin KL. Impact of hyperglycemia on early embryo development and embryopathy: in vitro experiments using a mouse model. Hum Reprod. 2007 Dec;22(12):3059-68.
150. Stachecki JJ, Yelian FD, Leach RE, Armant DR. Mouse blastocyst outgrowth and implantation rates following exposure to ethanol or A23187 during culture in vitro. J Reprod Fertil. 1994 Aug;101(3):611-7.
151. Haimovici F, Anderson DJ. Effects of growth factors and growth factor-extracellular matrix interactions on mouse trophoblast outgrowth in vitro. Biol Reprod. 1993 Jul;49(1):124-30.
152. ImageJ. ImageJ for microscopy - Image processing and analysis in Java. ImageJ 1.43e ed: National Institute of Health; 2009. p. disponível em: http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html.
153. Xu J, Cheung TM, Chan ST, Ho PC, Yeung WS. Human oviductal cells reduce the incidence of apoptosis in cocultured mouse embryos. Fertil Steril. 2000 Dec;74(6):1215-9.
154. Sydbom A, Blomberg A, Parnia S, Stenfors N, Sandstrom T, Dahlen SE. Health effects of diesel exhaust emissions. Eur Respir J. 2001 Apr;17(4):733-46.
155. Shimada A, Kawamura N, Okajima M, Kaewamatawong T, Inoue H, Morita T. Translocation pathway of the intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the blood circulation in the mouse. Toxicol Pathol. 2006;34(7):949-57.
156. Peters A, Veronesi B, Calderon-Garciduenas L, Gehr P, Chen LC, Geiser M, et al. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. Part Fibre Toxicol. 2006;3:13.
157. Wallenborn JG, McGee JK, Schladweiler MC, Ledbetter AD, Kodavanti UP. Systemic translocation of particulate matter-associated metals following a single intratracheal instillation in rats. Toxicol Sci. 2007 Jul;98(1):231-9.
158. Perin PM, Maluf M, Czeresnia CE, Januario D, Saldiva P. Effects of exposure to high levels of particulate air pollution during the follicular phase on treatment outcome in couples undergoing in vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET). Fertil Steril. 2008;90(Suppl):S50-1.
159. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. Nat Genet. 2000 Apr;24(4):372-6.

160. Tielens S, Verhasselt B, Liu J, Dhont M, Van Der Elst J, Cornelissen M. Generation of embryonic stem cell lines from mouse blastocysts developed in vivo and in vitro: relation to Oct-4 expression. Reproduction. 2006 Jul;132(1):59-66.
161. Jedrusik A, Parfitt DE, Guo G, Skamagki M, Grabarek JB, Johnson MH, et al. Role of Cdx2 and cell polarity in cell allocation and specification of trophectoderm and inner cell mass in the mouse embryo. Genes Dev. 2008 Oct 1;22(19):2692-706.
162. Fleming TP, Kwong WY, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, et al. The embryo and its future. Biol Reprod. 2004 Oct;71(4):1046-54.
163. Pampfer S. Apoptosis in rodent peri-implantation embryos: differential susceptibility of inner cell mass and trophectoderm cell lineages--a review. Placenta. 2000 Mar-Apr;21 Suppl A:S3-10.
164. Tam PP. Postimplantation development of mitomycin C-treated mouse blastocysts. Teratology. 1988 Mar;37(3):205-12.
165. Lane M, Gardner DK. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. Biol Reprod. 2003 Oct;69(4):1109-17.
166. Chan WH. Ginkgolide B induces apoptosis and developmental injury in mouse embryonic stem cells and blastocysts. Hum Reprod. 2006 Nov;21(11):2985-95.
167. Kuijk EW, Du Puy L, Van Tol HT, Oei CH, Haagsman HP, Colenbrander B, et al. Differences in early lineage segregation between mammals. Dev Dyn. 2008 Apr;237(4):918-27.
168. Jurisicova A, Detmar J, Caniggia I. Molecular mechanisms of trophoblast survival: from implantation to birth. Birth Defects Res C Embryo Today. 2005 Dec;75(4):262-80.
169. Detmar J, Rabaglino T, Taniuchi Y, Oh J, Acton BM, Benito A, et al. Embryonic loss due to exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons is mediated by Bax. Apoptosis. 2006 Aug;11(8):1413-25.
170. Li N, Hao M, Phalen RF, Hinds WC, Nel AE. Particulate air pollutants and asthma. A paradigm for the role of oxidative stress in PM-induced adverse health effects. Clin Immunol. 2003 Dec;109(3):250-65.
171. Hentemann M, Bertheussen K. New media for culture to blastocyst. Fertil Steril. 2009 Mar;91(3):878-83.