MARIANA MATERA VERAS

Efeitos da poluição do ar da cidade de São Paulo sobre o processo reprodutivo de camundongos com ênfase no desenvolvimento da placenta e cordão umbilical

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Marisa Dolhnikoff

**São Paulo
2008**

Ao meu filho, **José Guilherme**, com todo meu amor,

À minha vó, **Luzia**, por sua sabedoria e amor inesgotável,

À minha mãe, **Ione**, sem ela nada seria possível,

À minha tia, **Julia Matera**, pelo exemplo e apoio,

À Profa. **Elia Caldini**, pela amizade e confiança,

Ao querido **Prof. Paulo Saldiva**, com toda minha admiração.

“Every day I remind myself that my inner and outer life are based on the labors of other men, living and dead, and that I must exert myself in order to give in the same measure as I have received and am still receiving.” -**Albert Einstein**

É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.
Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver- **Martin Luther King**

AGRADECIMENTOS

Profa. Marisa Dolhnikoff, minha orientadora, quem admiro por sua seriedade, competência, paciência; inteligência. Agradeço do fundo do meu coração por me aceitar, mesmo sem me conhecer, como orientada, por tudo que me ensinou nestes anos de convivência e por sua disponibilidade e desprendimento para ensinar.

Profa. Elia Caldini, mas que eu prefiro chamar só de Elia, sem você esta tese com certeza não existiria, e é por você que este trabalho se concretizou. Eu cheguei até aqui, seguindo suas orientações, seus ensinamentos, às vezes errando, mas também acertando. Obrigada por tudo!

Ao Prof Paulo Saldiva, mais conhecido como Pepino, agradeço pelos ensinamentos, estímulo e confiança em meu trabalho; pela amizade e atenção, por sua bondade e sabedoria.

Aos Professores Terry Mayhew (University of Nottingham) e Antonio A. C.M. Ribeiro (FMVZ/USP) por me ajudarem a desvendar o “Mundo da Estereologia”.

A todos os professores (do ensino fundamental à graduação), em especial à Profa. Vanda Trettel (UBC), agradeço por me educarem e fornecerem a base de conhecimento sobre a qual “ergo” hoje esta tese de doutorado.

À minha Família querida (mãe, pai, vó, tia e meu filhote) que sempre esteve do meu lado, me apoiando em todos os sentidos para que eu concluísse meu Doutorado e para que eu continue nesse caminho.....

Nilsa (Damaceno-Rodrigues, NR) e Rosane (Silva, RMG)

Como não lembrar e agradecer a estas duas amigas maravilhosas que fizeram e fazem parte desta tese e da minha vida, que em todos os momentos bons e ruins estiveram SEMPRE presente....

Em especial agradeço a todos que de uma forma ou de outra, desde uma simples limpeza das caixas dos animais experimentais até o procedimento mais elaborado, contribuíram significativamente ($P < 0,005$) para que este estudo se concretizasse. Estas pessoas são:

Ângela B. Gomes e Maria Cristina Medeiros (Lab Imuno-histoquímica-FMUSP);
Maria Iris A. Mendes e Marcelo A. Ferreira (LIM 59-FMUSP);
Miriam R. P. Taborda Simone, Maria Margarida T. Monteiro, Hélio Correa, Maria
Cecília S. L. Marcondes; Maria do Rosário L. Aguiar, e Adão C. Sobrinho (Centro
Multiusuário de Microscopia Eletrônica-LIM59-FMUSP);
Ana Julia Lichtenfels, Regiane C. Oliveira e Heloisa M.B. Guimarães (LIM05-FMUSP);
Davi Francisco, D. Emília e Carlos Eduardo (LIM05-FMUSP).

Agradeço também aqueles que cuidaram de toda parte burocrática do projeto: cotações, compras, agendamentos de reuniões, reservas, etc....
Obrigada pela presteza e agilidade: Adalzira, Cristina V. C. Fonseca, Gildásio V. Rocha, Rafaela, Valéria V. Sales, Tânia e Sônia.

Agradeço também o apoio financeiro

FAPESP (Fundação de Amparo a Pesquisa do estado de São Paulo)
Processo nº 05/54857-3
Processo nº 2003/10772-9

FFM (Fundação Faculdade de Medicina)-USP

LIM59- (Laboratório de Biologia Celular)-FMUSP

LIM05-(Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental)-FMUSP

E por fim agradeço a meus cães de estimação, que hoje somam 19 vira-latas, pela fidelidade, alegria, companheirismo, e que mesmo sem saber o que é um Doutorado me deram força e compreenderam minha ausência, a falta de banhos, de brincadeiras, sem nunca deixar de “abandar o rabo” ao me encontrarem!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Lista de Tabelas

Lista de Figuras

Lista de Quadros

Resumo

Summary

1.Introdução	1
2. Revisão da Literatura.....	2
2.1 Poluição do ar e seus efeitos sobre a saúde	3
2.1.1 Alterações cardio-respiratórias dependentes da poluição atmosférica	4
2.1.1.1 Em São Paulo	5
2.1.2 Alterações gestacionais dependentes da poluição atmosférica	6
2.1.2.1.Mortalidade neonatal e pós-neonatal	8
2.1.2.2 Partos prematuros.....	9
2.1.2.3 Baixo peso do recém-nascido	10
2.1.3 Evidência experimental dos efeitos da poluição do ar sobre a fertilidade	12
2.2 Função reprodutiva X Substâncias tóxicas.....	14
2.3 Fases nutricionais embrionárias em camundongos/ placentação.....	16
2.4 Estrutura da placenta cório-alantoidiana	19
2.5 Ciclo estral em camundongos	23
2.6 Cordão umbilical	24
2.7 Prováveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos.....	27
3. Justificativa	39
4. Objetivos	40
5. Delineamento experimental	41
6. Material e Métodos.....	43

6.1 Exposição.....	43
6.2 Grupos experimentais.....	44
6.3 Avaliação do Ciclo Estral	45
6.4 Contagem dos Folículos Ovarianos	46
6.5 Avaliação da Capacidade Reprodutiva	47
6.6 Desfechos reprodutivos relacionados ao casal	48
6.7 Desfechos gestacionais	49
6.8 Avaliação estereológica e morfométrica da placenta e do cordão umbilical	50
6.8.1 Placenta	50
6.8.2 Cordão umbilical:	60
6.8.2.1.Determinação do estresse oxidativo na parede dos vasos umbilicais).....	63
6.9 Avaliação da fase gestacional mais crítica	65
6.10 Análise estatística.....	66
7. Resultados	68
7.1 Níveis de Poluição	69
7.2 Desfechos reprodutivos relacionado à fêmea	69
7.3 Desfechos reprodutivos relacionados ao casal	71
7.4 Desfechos gestacionais	72
7.5 Placenta	73
7.6 Cordão Umbilical.....	78
7.7 Período crítico da gestação relacionado ao baixo peso ao nascer	82
8. Discussão	83
9.Conclusões.....	98
10. Referências	99
Apêndices	
9.1 Artigo publicado	
9.2 Artigos submetido e/ou em finalização	

LISTA DE ABREVIATURAS

Al- alumínio

C- carbono

Ca - cálcio

Cd- cádmio

CO- monóxido de carbono

CO₂-dióxido de carbono

Cu- cobre

DNA- ácido desoxirribonucléico

dpc- dias pós concepção

Fe- ferro

HC- hidrocarbonetos

HE- hematoxilina-eosina

HPA- hidrocarboneto policíclico aromático

K- potássio

MP- material particulado

Na- sódio

NaCl- cloreto de sódio

P- fósforo

Pb- chumbo

ROS- espécies reativas de oxigênio

S-enxofre

Si- silício

V- vanádio

Zn- zinco

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Análise descritiva da composição elementar presente nas amostras de PM _{2.5}	70
Tabela 2. Média (DP) dos parâmetros referentes ao ciclo estral e contagem de folículos ovarianos.....	71
Tabela 3. Média (SD) dos valores referentes aos parâmetros de desfecho reprodutivo relacionados ao casal.....	72
Tabela 4. Média (SD) para os parâmetros referentes aos desfechos gestacionais...	73
Tabela 5. Efeito do período de exposição (pré-gestacional e gestacional) no tamanho da ninhada, no peso fetal e volumes placentários	76
Tabela 6. Efeitos do período de exposição (pré-gestacional e gestacional) nas superfícies de troca, calibres dos vasos e espaços sanguíneos, espessura aritmética da barreira e condutâncias total e massa-específica.....	77
Tabela 7. Efeito da exposição no volume (mm ³) dos compartimentos e estruturas vasculares do cordão umbilical.....	79
Tabela 8. Efeito da exposição ao ar não-filtrado na área seccional do cordão e vasos umbilicais (μm ²), razão luz/parede e espessura da parede dos vasos umbilicais....	79
Tabela 9. Fração de área ocupada por marcação imuno-positiva para Isoprostano e Receptor de Endotelina-1 na parede dos vasos umbilicais.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Desenho esquemático da placenta e da barreira intervacular.....	20
Figura 2- Fotografia de feto de camundongo (a) e fotomicrografia de corte histológico do cordão umbilical de camundongo 18 dpc.....	25
Figura 3- Representação esquemática das câmaras de exposição.....	43
Figura4- Representação esquemática do protocolo de criação dos animais experimentais.....	45
Figura5- Procedimento para obtenção das placentas e cordões umbilicais.....	51
Figura 6- Esquema de amostragem da placenta para estudo estereológico.....	53
Figura 7- Exemplo da aplicação do sistema teste de pontos utilizando o IMAGE J para avaliação quantitativa das estruturas placentárias.....	56
Figura 8- Aplicação do sistema teste de arcos ciclóides para estimar as áreas de superfícies.....	58
Figura 9- Esquema de inclusão e face de corte do cordão umbilical.....	61
Figura 10- Fotomicrografia de cortes histológicos da placenta.....	77
Figura 11- Fotomicrografia de corte de vasos do cordão umbilical marcado para identificação de isoprostano.....	81
Figura 12- Fotomicrografia de corte de vasos do cordão umbilical marcado para identificação de ETAR.....	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Classificação dos estágios do ciclo estral de acordo com a citologia vaginal..... 46

Quadro 2- Períodos de exposição dos grupos de animais em câmara recebendo ar não filtrado (nf) ou ar filtrado (f) de acordo com as fases da gestação..... 65

RESUMO

A poluição do ar é um importante fator ambiental de risco para muitos desfechos gestacionais e reprodutivos negativos. Neste estudo nós investigamos os efeitos da poluição particulada em dois períodos de exposição (antes da concepção e durante a gestação) sobre alguns desfechos reprodutivos e gestacionais em camundongos. Utilizando câmaras de exposição, uma recebendo ar filtrado (F) e outra ar não-filtrado (nF), observamos que as fêmeas expostas ao ar não filtrado apresentaram alterações na duração do ciclo estral, estro persistente e o número de folículos antrais reduziu cerca de 36% ($75 \pm 35,2$, $P=0,04$) comparado às expostas ao ar filtrado ($118,6 \pm 18,4$). Nossos resultados mostram ainda um aumento significativo no tempo necessário para que o acasalamento ocorra, uma diminuição nos índices de fertilidade e gestação ($P=0.003$) nos casais expostos ao ar não filtrado (nF). A taxa média de perdas pós implantacionais (PPI) está aumentada em 70% ($P \leq 0,005$) no grupo de fêmeas expostas ao ar não filtrado antes e durante a gestação quando comparada ao grupo exposto antes e durante a gestação ao ar filtrado. O peso fetal (PF) é significativamente maior no grupo exposto nos dois períodos ao ar filtrado quando comparado aos demais grupos expostos antes e/ou durante a gestação ao ar não filtrado. O PF e a taxa média de PPI são influenciados tanto pela exposição durante a gestação quanto a exposição que ocorre antes da gestação. A exposição materna prévia a gestação e durante a primeira fase gestacional são críticas para o aumento no risco de baixo peso em camundongos. Nós também verificamos que a exposição ao ar não filtrado está associada a uma redução no volume, calibre e área de superfície dos espaços sanguíneos maternos, a um aumento na área de superfície dos capilares fetais, e na condutância de difusão da placenta. Alterações morfológicas no cordão umbilical também foram encontradas. Este estudo demonstra que a exposição aos níveis ambientais de poluição particulada de origem veicular afeta diferentes funções e estágios do processo reprodutivo. Nossos resultados também indicam que a exposição materna prévia está ligada a desfechos gestacionais negativos mesmo quando a exposição ocorre somente antes da concepção.

DESCRITORES

1. Poluição do ar/efeitos adversos 2. Placenta 3. Cordão umbilical 4. Prenhez 5. Fertilidade 6. Ciclo estral 7. Camundongo/crescimento & desenvolvimento 8. Morfologia

SUMMARY

Air pollution is an important environmental health risk factor for many different gestational and reproductive negative outcomes. In this study we have investigated the effects of two different timing of exposure (before conception and during pregnancy) to urban ambient particulate matter on reproductive and pregnancy outcomes in mice. Using exposure chambers receiving filtered (F) and non-filtered (NF) we observed that exposed females presented changes in the length of estrus cycle, extended estrus and antral follicles number declined by 36% ($P=0.04$) in mice exposed to non filtered air (75 ± 35.2) compared to mice exposed to filtered air (118.6 ± 18.4). Our results further indicate a significant increase in time necessary to mating and decreased fertility and pregnancy indices ($P=0.003$) in NF couples. Mean postimplantation loss (PIL) rate was increased by 70% ($P\leq 0.005$) in the group exposed before and during pregnancy to non-filtered air when compared to the group exposed before and during pregnancy to filtered air. Fetal weight (FW) was significantly higher in group exposed during both periods to filtered air when compared to other groups exposed before and/or during pregnancy to non filtered air. FW and PIL mean rate were influenced by both pre-gestational ($p<0.01$) and gestational ($p<0.01$) period exposure. Maternal pre-gestational and the first stage of pregnancy exposure are critical to increased risk for low birth weight in mice. We also found that gestational exposure to non-filtered air was associated with reduced volumes, calibres and surface areas of maternal blood spaces and with greater fetal capillary surfaces and diffusive conductances of the placenta. Umbilical cord morphology was also altered. This study demonstrated that exposure to ambient levels of urban traffic generated particulate matter negatively affects different functions and stages of the reproductive process. Our results also indicate that maternal exposure to air pollution is linked to negative pregnancy outcomes even if maternal exposure occurs only before conception.

DESCRIPTORS

1. Air pollution/adverse effects 2. Placenta 3. Umbilical cord 4. Pregnancy 5. Fertility
6. Estrous cycle 7. Mice/growth & development 8. Morphology

1. INTRODUÇÃO

Os efeitos da poluição do ar sobre a saúde têm sido objeto de inúmeros estudos nos últimos anos (WHO, 2003). Embora haja um consenso sobre os efeitos adversos da poluição do ar sobre a gestação e sobre o desenvolvimento fetal (pré-maturidade, baixo peso do recém nascido, mortalidade neonatal, retardo no desenvolvimento intra-uterino), pouco se sabe sobre em que fase da gestação a exposição aos poluentes do ar seria mais prejudicial ou se há um poluente específico que seja mais nocivo (WHO, 2005). Também ainda não está explicado o mecanismo biológico pelo qual a poluição do ar influencia a gestação e o desenvolvimento do embrião/feto.

Uma hipótese sugere que a poluição do ar provocaria uma inflamação da placenta que comprometeria seu funcionamento. Outros acreditam, que a poluição do ar afeta o desenvolvimento placentário com relação aos mecanismos que são sensíveis ou que respondem a tensão de oxigênio. Há sugestões de que, no início da gestação, a exposição à poluição do ar provoque o desenvolvimento insuficiente do trofoblasto acarretando em vascularização precária da placenta. Alterações no desenvolvimento da placenta são responsáveis por parto pré-termo, teratogênese e aborto. Substâncias tóxicas atuam na função placentária, alterando o crescimento, a produção de hormônios e enzimas, a troca de gases, nutrientes e excretas e a diferenciação celular (Kannan et al., 2006). Os efeitos são facilmente observados em modelos de administração ou exposição involuntária a altas doses de toxinas, mas a exposição a níveis relativamente baixos, como na poluição atmosférica, é pouco estudada.

Tendo em consideração as controvérsias e as evidências, o presente trabalho fundamentou-se na necessidade de estudos mais precisos e sistemáticos sobre os efeitos da exposição à poluição do ar ambiental sobre o processo reprodutivo, com ênfase na morfologia funcional da placenta e do cordão umbilical.

2. REVISÃO DA LITERATURA

O Estado de São Paulo mantém desde a década de 70, pela CETESB, redes de monitoramento da qualidade do ar medindo os poluentes atmosféricos nas escalas locais e regionais. A Região Metropolitana de São Paulo é uma área prioritária, por apresentar uma forte degradação da qualidade do ar, característica da maior parte dos grandes centros urbanos (CETESB, 2003).

De acordo com as estimativas de 2003, as fontes de poluição (automóveis, indústrias, etc.) são responsáveis pelas emissões para a atmosfera de: 1,8 milhões de toneladas por ano (t/ano) de monóxido de carbono (CO), 415 mil t/ano de hidrocarbonetos (HC), 409 mil t/ano de óxidos de nitrogênio (NO_x), 67 mil t/ano de material particulado total (MP) e 37 mil t/ano de óxidos de enxofre (SO_x). A poluição particulada é uma mistura de partículas sólidas e líquidas suspensas no ar. De acordo com seu diâmetro, são divididas em MP₁₀ (<10µm, podem penetrar nas vias respiratórias inferiores), em MP_{2,5} (<2,5µm, podem penetrar nas regiões onde ocorrem trocas gasosas no pulmão) e partículas ultrafinas (<100nm) (CETESB, 2003).

Entre os constituintes da poluição do ar, o material particulado, parece ser o mais prejudicial para a saúde. O material particulado é uma complexa mistura de

partículas extremamente pequenas e gotículas líquidas, que incluem sulfatos, nitratos, amônia, aerossol carbonáceo, sais (NaCl), elementos do solo (Al, Si, Ca, Fe), metais pesados, água e material orgânico. O tamanho e a composição elementar deste material particulado estão diretamente relacionados com seus efeitos negativos (Andrade, 1993; CETESB, 2003).

Nos grandes centros urbanos o tráfego veicular é uma das principais fontes de emissão para o ambiente de material particulado. Em geral a fração de menor tamanho tem os maiores efeitos toxicológicos, particularmente mutagenicidade, citotoxicidade, reatividade com o DNA, devido a esta fração conter as maiores concentrações de HPA (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), semiquinonas, metais e metais de transição e grande capacidade de geração de radicais (Squadrito et al, 2001; Vinitketkumnun et al, 2002; Kok et al, 2006).

A variedade de substâncias que podem estar presentes na atmosfera é muito grande. Porém é preciso destacar que, mesmo se as emissões foram mantidas, a qualidade do ar pode variar em decorrência das condições meteorológicas, pois estas podem determinar uma maior ou menor diluição dos poluentes. É por isso que a qualidade do ar piora com relação aos parâmetros CO, MP e SO₂ durante os meses de inverno, quando as condições meteorológicas são mais desfavoráveis à dispersão dos poluentes (Andrade, 1993; CETESB, 2003; WHO, 2003).

2.1 Poluição do ar e seus efeitos sobre a saúde

A questão da poluição do ar ambiental tem se tornado cada vez mais importante. Não só com relação a problemas respiratórios e cardíacos decorrentes da exposição, mas também porque estudos epidemiológicos e experimentais têm mostrado uma associação entre exposição e problemas reprodutivos, tais como infertilidade, sub-fecundidade, falência ovariana, alterações comportamentais, aciclicidade menstrual/estral, abortos, baixo peso do recém nascido, restrição do crescimento intra-uterino, entre outros (Sharara et al, 1998).

2.1.1 Alterações cardio-respiratórias dependentes da poluição atmosférica

As evidências sobre os efeitos dos diferentes poluentes do ar sobre a saúde vêm de diversas fontes de informação, incluindo estudos epidemiológicos, estudos de exposição controlada em humanos e toxicológicos em animais. As pesquisas mostram que estes efeitos podem ser encontrados tanto em exposições de curto prazo como de longo prazo (Katsouyanni et al., 2001). Muitas evidências sugerem que, mesmo a exposição a baixos níveis dos principais poluentes do ar, pode provocar efeitos adversos sobre a saúde (Brunenkreef et al., 1995; Lin et al., 1999).

Em indivíduos com doenças pulmonares pré-existentes, a inalação de partículas induz a inflamação e aumenta os efeitos respiratórios e cardiovasculares através da indução do estresse oxidativo (Seaton, et al., 1995; Utell et al, 2000; Brook e Brook, 2003). Estudos sobre a inalação de altas concentrações de partículas em ratos demonstraram danos como fibrose pulmonar, tumores de pulmão, hiperplasia das células epiteliais, inflamação e aumento na expressão de citocinas

(Oberdoster, et al., 1994; Nikula et al., 1995; Dasenbrock et al., 1996; Driscoll et al., 1996).

O aumento da incidência de câncer de pulmão (Cohen, 2000; Pope et al., 2002) e o prejuízo do desenvolvimento da função pulmonar em crianças (Gauderman et al., 2000) também estão associados a altas concentrações ambientais de MP nas grandes cidades.

Além de efeitos no aparelho respiratório, estudos mais recentes mostram um comprometimento do sistema cardio-vascular (Nemmar et al., 2002a; Nemmar et al, 2002b).

Sabe-se que, em curto prazo, os efeitos são mais sentidos por idosos, crianças e pessoas com problemas cardíacos e pulmonares pré-existentes (Pope e Dockery, 1992; Schwartz e Neas, 2000; Goldberg et al., 2001) e que, em longo prazo, a exposição pode reduzir a longevidade (Dockery et al., 1993; Pope et al., 1995; Schwartz, 2000), e diminuir a expectativa de vida em 1-2 anos para diferenças reais de exposição (Brunenkreef, 1997).

2.1.1.1 Em São Paulo

Diversos estudos foram e estão sendo realizados para se conhecer e avaliar os efeitos sobre a saúde da poluição do ar na cidade de São Paulo. Os dados já obtidos revelaram que os idosos e as crianças são mais suscetíveis aos efeitos da poluição no que diz respeito a doenças respiratórias e cardiovasculares (Saldiva et

al., 1994; Miraglia, 1997; Lin et al., 1999; Gouveia e Fletcher, 2000a; Gouveia e Fletcher, 2000b; Braga et al., 2001; Conceição et al., 2001; Ribeiro e Cardoso, 2003).

Verificaram também que a poluição aumenta o número de admissões hospitalares, mortalidade e emergências por problemas respiratórios (Souza et al., 1998; Sih, 1999; Lin et al., 2003; Freitas et al., 2004).

A exposição à poluição atmosférica em São Paulo pode provocar alterações inflamatórias das vias aéreas em animais e humanos, alterações no transporte mucociliar, alterações no perfil secretor de mucinas do epitélio respiratório e alterações do parênquima e vasos pulmonares (Bohm et al., 1989; Lemos et al., 1994; Macchione et al., 1999; Batalha et al., 2002; Saldiva et al., 2002).

Estudos prévios nos fornecem indícios de que o ar atmosférico de São Paulo é poluído o bastante para desencadear lesões cardio-respiratórias; isto nos permitiu supor que nossa cidade representa um ambiente adequado para se testar a efeito da poluição sobre a eficiência reprodutiva de camundongos e investigar se alterações placentárias e umbilicais podem estar relacionadas à exposição.

2.1.2 Alterações gestacionais dependentes da poluição atmosférica

Mortalidade pós-neonatal [número de mortes entre o 28º dia e o 1º ano de vida por 1000 nascidos vivos] e neonatal [número de mortes neonatais entre o 0-27º dia de vida por 1000 nascimentos], prematuridade, o baixo peso ao nascer [peso ao nascer inferior a 2500g] (WHO, 1992) e a qualidade do sêmen, têm sido

utilizados como parâmetros para avaliar os efeitos da exposição à poluição do ar sobre o processo reprodutivo em humanos.

Os trabalhos têm mostrado que a poluição do ar está interferindo negativamente no processo reprodutivo e em particular afetando desfecho gestacional, a fertilidade e a saúde fetal (WHO, 2005). Os fetos são considerados um dos subgrupos da população mais vulneráveis aos efeitos da poluição do ar, devido à imaturidade do sistema imunológico e por terem uma expectativa de vida longa após a exposição.

Porém poucos estudos têm sido realizados retratando os efeitos do ar ambiental poluído na saúde reprodutiva feminina. Os trabalhos publicados, em sua maioria, são estudos epidemiológicos que avaliam parâmetros gestacionais, e entre eles encontramos grande heterogeneidade com relação aos poluentes associados, métodos estatísticos empregados e os co-fatores considerados (Lacasaña et al., 2004).

Entretanto há uma considerável consistência entre os resultados mostrados por estudos epidemiológicos com relação ao prejuízo da exposição sobre os desfechos gestacionais, principalmente aqueles relacionados à exposição ao material particulado.

Estes trabalhos realizados na Europa, Ásia e América do Norte comprovam que a poluição compromete o desenvolvimento do feto. Porém, ainda não são bem conhecidos os mecanismos biológicos pelos quais os diferentes tipos de poluentes do ar afetariam o funcionamento da placenta e o crescimento fetal.

Também não está esclarecido se, os efeitos são decorrentes de um poluente específico ou da interação de diversos poluentes e, sobre qual período da gestação a exposição seria mais crítica. Segue-se uma breve revisão específica para este tema.

2.1.2.1 Mortalidade neonatal e pós-neonatal

Evidências sugerem que a exposição a níveis elevados de MP_{10} e SO_2 , ou mesmo a níveis aceitáveis está correlacionada a taxas de morte neonatal e pós neonatal aumentadas, particularmente devido doenças respiratórias (Penna e Duchade, 1991; Bobak e Leon, 1992, 1999b). Estes estudos mostram que os impactos da exposição à poluição variam de acordo coma dose.

Em 2004 foi avaliado risco de morte pós-neonatal relacionado à exposição ao material particulado (MP_{10}) em 23 áreas metropolitanas dos Estados Unidos, e os resultados sugerem que a exposição a níveis acima de $12 \mu m^3 / m^3$ MP_{10} contribuem para a morte pós-neonatal (Kaiser et al., 2004).

A mortalidade neonatal não mostra uma associação consistente com a concentração de material particulado. Um estudo conduzido no EUA reportou uma associação positiva (Lipfert et al., 2000), outro um efeito limítrofe (Bobak e Leon, 1992) Embora um estudo caso-controle não encontrou associação significativa (OR = 1.04; 95% CI: 0.99–1.10) (Bobak e Leon 1999a). Outros estudos conduzidos em regiões geográficas diferentes não mostraram evidências de uma associação (Lave e Seskin, 1972; Joyce et al. 1989; Bobak e Leon 1999b; Shinkura et al. 1999).

Estudos conduzidos em São Paulo (Lim et al., 2004) e na Coréia (Ha et al. 2003) encontraram associação entre as concentrações de MP_{10} e SO_2 e mortalidade neonatal e pós neonatal.

Woodruff et al. (1997) analisou a associação entre morte pós neonatal e os níveis de PM_{10} em aproximadamente 4 milhões de bebês nascidos entre 1989 e 1991 nos EUA, e encontrou que em bebês com peso ao nascer normal a concentração de PM_{10} estava associada a mortes por problemas respiratórios (risco relativo 1,40; 95% IC(intervalo de confiança): 1,05–1,85) e a síndrome da morte súbita (risco relativo 1,26; 95% IC: 1,14–1,39).

2.1.2.2 Partos prematuros

O nascimento prematuro é uma das principais causas de morbidade e mortalidade neonatal, e há evidências, embora as vezes muito pequena, de que a exposição materna à poluição do ar durante a gestação está associada a um aumento no risco de parto prematuro.

Ritz et al. (2000) observaram que a exposição a níveis ambientais elevados de PM_{10} e possivelmente de CO podem contribuir para a ocorrência de parto prematuros no sudoeste da Califórnia. Xu et al. (1995) estimaram uma redução da duração da gestação em 0,075 semana (12,6h) e 0.042 semanas (7,1 h) para cada $100\text{-}\mu\text{g}/\text{m}^3$ de aumento nas concentrações médias de dióxido de enxofre e partículas totais suspensas, respectivamente, calculadas pela média móvel de sete dias.

Mohorovic (2004) observou que uma exposição maior e mais longa às emissões de SO₂ durante os dois meses iniciais da gestação resulta em uma gestação mais curta.

Dois estudos recentes conduzidos em Sidney e Brisbane, na Austrália, encontraram uma relação entre a exposição materna e concentrações relativamente baixas dos poluentes do ar com a ocorrência de partos prematuros. Em Brisbane (Hansen et al., 2006; Mannes et al., 2005) a exposição a PM₁₀ e O₃ durante o primeiro trimestre está associada a um risco aumentado de parto prematuro e em Sidney, os níveis de ozônio durante o primeiro trimestre, e os níveis de dióxido de enxofre no mês de concepção estão associados ao maior risco.

2.1.2.3 Baixo peso do recém-nascido

O baixo peso do recém nascido é o efeito mais associado à exposição à poluição do ar, indicando que o crescimento fetal e a duração da gestação estão sendo afetados. O peso ao nascer é um importante indicador do subsequente status da saúde, bebês com baixo peso são mais susceptíveis a desenvolver hipertensão, doenças coronarianas e diabetes não dependente de insulina na vida adulta (Baker, 1995; Osmond e Baker, 2000). Diferentes estudos realizados na China (Wang et al, 1997), República Tcheca (Djemek et al, 1999) e Estados Unidos (Ritz e Yu, 1999) apontam que a alta concentração de SO₂ e de MP como os principais responsáveis pelo aumento de risco de baixo peso do recém-nascido.

Além destes, outros poluentes também podem estar envolvidos como o CO e NO₂ (Ha et al, 2001; Maisonet et al., 2001; 2004).

Um estudo conduzido em São Paulo encontrou evidências que a exposição materna aos níveis ambientais de PM₁₀ e CO durante o primeiro trimestre da gestação está associado a uma redução do peso ao nascer (Gouveia et al, 2004). Wang et al. (1997) e Rogers et al. (2000) encontraram uma significativa relação entre exposição-resposta entre a exposição maternal a dióxido de enxofre e material particulado total em suspensão durante o terceiro trimestre da gestação e o peso ao nascer.

Em Sidney na Austrália, Mannes et al. (2005) calcularam que para 1 µg/m³ de aumento na concentração média de material particulado uma redução de 4 g (95% CI: 3 to 6) no peso ao nascer é esperada.

Considerando todos os estudos que tratam da exposição à poluição do ar e baixo peso ao nascer, as partículas e o SO₂ parecem ser os poluentes mais freqüentemente associados a este efeito.

Além do baixo peso, outros fatores antropométricos foram associados à exposição. Jedrychowski et al (2004) chamou a atenção para o fato de que não somente o peso ao nascer, mas também reduções na altura e diâmetro da cabeça do neonato podem ser causadas pela exposição pré-natal a poluição do ar durante a gestação.

De modo interessante, a literatura mostra uma controvérsia nos estudos com seres humanos que investigam qual seria o período da gestação, mais susceptível ao aumento do risco de baixo peso do recém-nascido em decorrência da

exposição a poluição; ao que parece a exposição em qualquer fase da gestação comporta aumento de risco, pois há evidências desta correlação para os dois primeiros meses, para o segundo e quarto mês, para a exposição ao MP_{10} , e do 3º ao 5º mês para a exposição ao SO_2 e NO_2 (Liu et al., 2003; Mohorovic et al., 2004; Wang et al 1997; Ritz e Yu, 1999; Bobak, 2000; Maisonet et al., 2001 Lee et al., 2003).

Todos os estudos, até agora, focaram na exposição que ocorre durante a gestação, embora a epidemiologia ocupacional tenha mostrado que a exposição parental a certos contaminantes ambientais que ocorre antes da concepção podem também afetar a gestação e o desenvolvimento fetal (Knight e Marrett, 1997; Shaw e Gold, 1988; O'Halloran e Spickett, 1992; Silbergeld e Patrick, 2005).

Com o objetivo de avaliar os efeitos da exposição à poluição ambiental em diferentes períodos, no presente estudo investigamos os efeitos da exposição pré-concepcional e gestacional no desenvolvimento fetal, avaliando qual o período mais crítico para o comprometimento do peso fetal.

2.1.3 Evidência experimental dos efeitos da poluição do ar sobre a fertilidade

A literatura científica é extremamente pobre no que se refere ao estudo experimental utilizando animais de laboratório expostos a condições ambientais reais das grandes cidades para obtenção de dados sobre a eficiência reprodutiva.

De modo geral, os dados da literatura limitam-se a compêndios sobre teratogênese.

O nosso grupo de pesquisa, utilizando as câmaras de inalação para manutenção dos animais expostos e controles, está se empenhando nesta área de estudo.

Em 2005, foi publicado (Mohallem et al., 2005) o primeiro dos trabalhos desta nova linha de pesquisa do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LIM 05) HCFMUSP. Utilizando câmaras de exposição recebendo ar filtrado e ar ambiente, o nosso grupo mostrou que mesmo em níveis moderados camundongos fêmeas, que cresceram expostas à poluição ambiental, apresentaram menor número de filhotes nascidos vivos e maior índice de falha no processo de implantação uterina do que os animais que cresceram em câmara limpa ou que viveram na câmara poluída apenas depois de adultos. Estes dados são totalmente inéditos na literatura e abrem uma perspectiva nova, uma vez que se demonstra que a fertilidade feminina é um alvo para a poluição ambiental em condições reais.

E mais recentemente em 2007, utilizando as mesmas câmaras de exposição demonstramos que há uma diminuição na razão entre machos/fêmeas nascidos nas câmaras que recebiam ar ambiente (Lichtenfels et al., 2007).

2.2 Função reprodutiva X Substâncias tóxicas

A função reprodutiva feminina pode ser alterada por uma grande variedade de fatores tais como idade, reserva ovariana, doenças sexualmente transmissíveis, desequilíbrios hormonais, fatores genéticos e substâncias tóxicas presentes no meio

ambiente. Com relação às diferentes substâncias tóxicas e seus efeitos outros aspectos devem ser considerados, tais como: tipo e características do agente tóxico ou da mistura de agentes, tipo de exposição, a intensidade, a duração, a susceptibilidade do órgão alvo, o estágio de desenvolvimento em que organismo se encontra e a quantidade de exposição, pois podem contribuir para potencializar os efeitos (Sharara, et al., 1998).

O comprometimento da função reprodutiva devido à ação de substâncias tóxicas pode ocorrer em vários pontos do sistema endócrino-reprodutor alterando uma variedade de processos fisiológicos altamente integrados ou provocando alterações estruturais e conseqüentemente funcionais dos órgãos reprodutores ou endócrinos associados (Mattison, 1985).

A ação de um agente tóxico pode ser direta ou indireta. Efeitos diretos geralmente ocorrem quando a substância é estruturalmente semelhante a uma molécula endógena ou capaz de entrar nos órgãos reprodutores. Já os efeitos indiretos ocorrem quando a substância tóxica exige uma conversão metabólica antes de ser capaz de exercer seu efeito, interferindo em sistemas que não o reprodutivo ou alterando a síntese e metabolismo de hormônios; ou ainda quando a substâncias interfere com hormônios endógenos, mimetizando ou bloqueando a ação dos hormônios naturais (Mattison et al., 1983).

As substâncias que influenciam negativamente o sistema endócrino são chamadas de disruptores endócrinos. Essas substâncias podem agir como agonistas ou antagonistas nos receptores celulares, minimizando ou bloqueando a resposta celular nas glândulas endócrinas tais como adrenal, tiróide e ovário; eixo

hipotálamo-hipófise; e essa perda do equilíbrio hormonal pode resultar na perda do funcionamento normal do sistema reprodutor, limitando assim o sucesso reprodutivo (Miller et al., 2004).

A exposição a metais pesados, incluindo aqueles presentes na poluição atmosférica (Pb, Cd), tem sido associada a diversos resultados reprodutivos negativos em humanos e animais de laboratório. Em roedores, o chumbo suprime o FSH alterando o metabolismo de esteróides, em fêmeas gestantes e em fase de lactação foi observado um menor metabolismo de progesterona nos ovários, bem como uma diminuição na ligação nos receptores de LH e FSH (Wiebe e Barr, 1988; Goyer, 1993). Fêmeas de camundongo expostas ao chumbo não apresentaram alterações nos hormônios esteróides ovarianos, mas o número de folículos e corpos lúteos mostrou-se 70% menos que no grupo controle (Wide, 1985).

Um estudo experimental em camundongos demonstrou que há uma destruição da reserva folicular em fêmeas expostas durante o período de vida intra-uterina a fumaça do cigarro; resultando na perda prematura da fertilidade, uma vez que o período reprodutivo de uma fêmea é determinado pelo número de oócitos presentes no “pool” ovariano, uma vez que este número é determinado durante o período pré-natal (Hoyer e Sipes, 1996).

Ovário é o principal órgão do sistema reprodutivo feminino, ele é responsável pelo desenvolvimento folicular e pela produção de hormônios esteróides. Sustâncias químicas que afetam o ovário podem, portanto ter efeito sobre a fertilidade, sobre o ciclo menstrual-estral e sobre o início da puberdade e da menopausa. A produção de hormônios (estrógeno, progesterona) pelos ovários é

regulada em resposta a hormônios hipofisários (glândula pituitária), FSH e LH, que por sua vez são secretados em resposta ao GnRH que é secretado pelo hipotálamo. Conseqüentemente a ovulação é regulada pelo sistema neuroendócrino. Assim a toxicidade sobre o ovário após a exposição química pode ocorrer através da ação direta sobre o ovário ou indiretamente modulando a via de sinalização hormonal (Miller et al., 2004).

Assim, para avaliar alterações na capacidade reprodutiva dos animais expostos, no presente trabalho acompanhamos o ciclo estral, quantificamos a reserva folicular ovariana e avaliamos alguns índices reprodutivos relacionados ao casal e à gestação em animais expostos e não expostos à poluição do ar.

2.3 Fases nutricionais embrionárias em camundongos/ placentação.

A principal função da placenta é permitir que o feto e a mãe interajam com o propósito de promover o crescimento e a viabilidade fetal de modo a preservar o bem-estar materno. Esta interação é possível graças a regiões especializadas nas quais células de dois indivíduos estão em associação. O desenvolvimento desta interface é um processo que envolve a formação e maturação da placenta bem como a modificações de tecidos maternos.

O desenvolvimento da placenta em roedores é alvo de inúmeros estudos, por tratar-se do grupo mais comumente usado como animal de laboratório. Excelentes revisões sobre os mais diversos aspectos deste assunto podem ser encontradas em: Watson e Cross, 2005; Cross, 1998; 2005; Carter e Enders, 2004;

Cross et al., 1994; 2002; 2003; Georgiades et al., 2002; Muntener et al., 1977. Limitaremos-nos aqui a fazer uma breve explanação das diferentes fases nutricionais e da morfologia placentária baseada nas referências citadas acima.

Após a fecundação o zigoto/embrião em desenvolvimento passa por três períodos diferentes em termos de nutrição e relação materno-fetal, apresentando peculiaridades nos processos de troca entre o conceito e a mãe, que nos interessam diretamente, pois um de nossos objetivos é estabelecer em qual das fases do desenvolvimento embrionário existe maior susceptibilidade aos agentes poluentes.

Fase Histotrófica: Durante os primeiros 5 dias da gestação o embrião se nutre e realiza trocas gasosas através das substâncias ricas em carboidratos, proteínas e lipídeos secretadas pelas glândulas endometriais (Burton et al., 2002; Hempstock et al., 2004). Embora o trofoblasto (que é o tecido fetal extra-embrionário responsável pelas trocas materno-fetais) esteja em contato direto com o epitélio uterino, este ainda se encontra íntegro.

Fase de nutrição pela placenta vitelínica: Com a implantação do embrião (entre o 5º e o 6º dia), a superfície externa do trofoblasto entra em contato com a decídua endometrial ou com epitélio uterino, caso este não tenha se degenerado. Este contato induz a diferenciação das células trofoblásticas em células gigantes típicas (células poliplóides que realizam duplicação de DNA sem divisão celular), cujos prolongamentos delimitam espaços que no 7º dia já estão preenchidos com

sangue materno. Enquanto isso, o saco vitelínico está se desenvolvendo e, nos roedores, apresenta-se invertido (o revestimento endodérmico está voltado para a região do trofoblasto). Assim, no 7º dia, o estrato endodérmico do saco vitelínico está associado internamente ao trofoblasto e a face externa do trofoblasto está em contacto direto com as estruturas maternas. Porém, neste tempo, ainda não há troca materno-fetal, pois a circulação do saco vitelínico ainda não está estabelecida. No 8º dia, com o desenvolvimento da mesoderme extra-embionária (tecido responsável pela formação dos vasos do saco vitelínico), as trocas materno-fetais podem ser feitas pela placenta vitelínica e este será o meio para a nutrição até o estabelecimento definitivo da placenta cório-alantoidiana. A literatura é muito escassa em relação a estudos sobre este período, porém muito recentemente (em maio de 2005) surgiu um trabalho mostrando que a exposição de embriões de camundongos ao etanol provoca inicialmente hipodesenvolvimento do saco vitelino e alterações morfológicas das suas células endodérmicas, o que contribui para os efeitos teratogênicos observados (Xu et al., 2005).

Fase de nutrição pela placenta cório-alantoidiana: Desde o 5º dia de gestação a área de trofoblasto situada no pólo embrionário começa a sofrer modificações: inicialmente, ocorre proliferação celular levando à formação de um cone trofoblástico ectoplacentário; no 6º dia, algumas destas células já se apresentam como células gigantes; no 7º dia, aparecem espaços preenchidos por sangue materno por entre as células gigantes na porção do cone ectoplacentário voltada para o miométrio; no 8º dia, o processo de citodiferenciação progride ainda

mais e no 9º dia, a parede do alantóide com sua mesoderme já rica em vasos fetais encosta-se à face interna do trofoblasto na região do cone, completando a estrutura da placenta cório-alantoidiana. No 10º dia, os vasos fetais crescem para dentro do tecido trofoblástico já diferenciado dando origem ao labirinto placentário, local onde ocorrem trocas materno-fetais. A partir do 10º dia até 19º dia (parto), a placenta cório-alantoidiana será o principal local de trocas materno-fetais.

2.4 Estrutura da placenta cório-alantoidiana

A placenta nos camundongos é classificada como discóide e hemocorial, medindo 2 cm de diâmetro e 0,6cm de espessura. O termo hemocorial refere-se ao fato do sangue materno estar diretamente em contato com o trofoblasto, sem que haja a intermediação de nenhum tecido materno. De acordo com o número de camadas de células do trofoblasto, a placenta humana classifica-se como monocorial, tendo apenas uma camada de células trofoblásticas entre o sangue materno e a célula endotelial dos capilares fetais, enquanto que a placenta dos Roedores é principalmente do tipo hemotricorial, uma vez que apresenta três camadas de células trofoblásticas (ver Fig. 1a).

A camada de células em contato com o sangue materno é citotrofoblástica e descontínua e encontra-se pouco aderida à camada intermediária. Esta e a camada mais interna são compostas por trofoblasto sincicial e estão em íntima aposição.

Juntas, estas três camadas providenciam uma permeabilidade seletiva (membrana inter-hemal).

A forma das interdigitações materno-fetais também varia entre as espécies, podendo ser em forma labiríntica, lamelar, trabecular ou como vilos; os roedores possuem interdigitações labirínticas, enquanto que humanos apresentam vilos. Em cortes longitudinais, paralelos ao maior eixo dos vasos umbilicais, observam-se na placenta de camundongos estratos morfológicamente diferentes; ilustrados na Figura 1b. São eles:

Placa alantoideo-coriônica: Corresponde à superfície da placenta voltada para o feto. É nesta região que o cordão umbilical se insere e que os vasos fetais derivados do mesênquima alantoidiano se ramificam.

Labirinto: O nome “labirinto” diz respeito à disposição geométrica das interdigitações dos tecidos maternos e fetais. A região do labirinto se forma à

medida que o córion volumoso se ramifica como uma rede densa de vilosidades curtas e emaranhadas entre si. Ao mesmo tempo o sangue materno penetra nos espaços entre as vilosidades, de modo que a densidade de volume de tecido fetal é aproximadamente igual aos espaços vasculares. Na placenta vilosa (humana), as vilosidades partem da placa coriônica e se ramificam com padrão arborescente. As vilosidades labirínticas são constituídas por um eixo de tecido conjuntivo mesenquimal (contendo os capilares fetais) revestido por células trofoblásticas (Fig. 1), através das quais se realizam as trocas materno-fetais.

Zona Juncional ou Espongiotrofoblasto: É a região entre o labirinto e a decídua; apresenta-se composta por células trofoblásticas não sinciciais: células trofoblásticas gigantes, situadas na interface materno-placentária, células espongiotrofoblásticas e células trofoblásticas que acumulam glicogênio, intercaladas entre os outros tipos celulares. Esta região não contém sangue fetal, mas é atravessada por vasos maternos revestidos pelas células trofoblásticas extravasculares.

Decídua: O endométrio não se comporta como uma estrutura passiva sobre a qual o trofoblasto se desenvolve; pelo contrário, células semelhantes a fibroblastos da lâmina própria do útero entram em atividade proliferativa e diferenciam-se, formando um tecido especializado (decídua) rico em leucócitos apresentando inúmeras funções relativas à interação imunológica entre o feto e a mãe. As células deciduais têm capacidade proliferativa, secretam componentes da

matriz extracelular (colágeno e proteoglicanos), além de estarem envolvidas em processos de apresentação de antígenos. Apresentam formato fusiforme, com inúmeros prolongamentos e são ricas em filamentos de citoesqueleto constituídos por desmina, vimentina e α -actina, o que aproxima estas células aos miofibroblastos (Blumer et al, 1988).

Matriz extracelular na placenta :A região da placa coriônica (voltada para o feto) apresenta-se constituída por tecido conjuntivo mesenquimal, rico em vasos sangüíneos do feto. A partir da placa coriônica o tecido mesenquimal distribui-se no eixo das vilosidades do labirinto; sendo o eixo, portanto, continuo com a placa coriônica. O tecido conjuntivo da placenta apresenta-se rico em ácido hialurônico. O colágeno fibrilar aparece sob a forma de fibrilas e fibras delgadas formando uma trama frouxa que envolve os vasos sangüíneos fetais. Ao final da gestação, fibras colágenas mais grossas estão presentes na periferia da placenta. Durante todo o desenvolvimento placentário é possível encontrar quantidades abundantes de colágeno IV, laminina e fibronectina, além de microfibrilas de cerca 10nm de diâmetro, semelhantes àquelas pertencentes às fibras do sistema elástico. Ao final da gestação, a microscopia eletrônica permite evidenciar fibras elásticas maduras, muito delgadas (Oliver et al., 1999; Saylam et al., 2002):

Uma vez que todas as camadas em conjunto provêem os meios para a comunicação dinâmica e transferência de nutrientes, hormônios, íons, gases, excretas e água entre a mãe e o feto em desenvolvimento, neste projeto

quantificamos os diferentes elementos placentários através de métodos estereológicos.

2.5 Ciclo estral em camundongos

Os camundongos apresentam ciclo estral contínuo de 4-5 dias, que pode ser dividido de acordo com as modificações morfo-fisiológicas correspondentes ao ciclo ovárico, em quatro fases: proestro, estro, metaestro e diestro.

Estro: é a fase em que o estrógeno se sobrepõe sobre os outros hormônios, que desencadeia uma intensa hiperemia dos órgãos genitais, com conseqüente proliferação e hipersecreção dos epitélios genitais, desenvolvimento folicular e conseqüente ovulação. Nesta fase a fêmea está receptiva ao macho. Nesta fase os esfregaços vaginais mostram-se limpos e com a presença de células eosinofílicas ^a.

Metaestro: É caracterizado pela formação do corpo lúteo, e os óvulos maduros se deslocam em direção ao útero através do oviduto. Se a cópula não ocorre os corpos lúteos não se tornam ativos e regridem. Mas se a cópula ocorrer ele se torna ativo durante o período gestacional, neste caso os esfregaços mostram-se “sujos” e marcados pela presença de leucócitos e células eosinofílicas.

Diestro: esta fase corresponde à fase de regressão do corpo lúteo e de desenvolvimento folicular para a próxima ovulação (caso não tenha ocorrido a

^a Utilizando-se a técnica de Shorr

fecundação), e degeneração dos óvulos do ciclo anterior. Nesta fase os esfregaços mostram-se sujos e com a presença de células cianofílicas e leucócitos.

Proestro: e o período de maturação folicular e os esfregaços apresentam-se limpos e com a presença de células cianofílicas e eosinófilas.

Cada fase do ciclo estral pode ser identificada pela aparência do epitélio vaginal e da vulva. A vagina apresenta variações em sua arquitetura histológica em resposta à estimulação hormonal que permitem inferirmos as relações existentes entre o ciclo vaginal e a endocrinologia sexual. Por influência de estímulos hormonais é possível observar no epitélio vaginal fenômenos de descamação, diferenciação e proliferação (Montes et al., 1978).

2.6 Cordão umbilical

O cordão umbilical é uma estrutura vital para o desenvolvimento e bem estar do conceito, sua função é de transportar nutrientes e oxigênio da placenta para o feto e retornar excrementos do feto para a placenta.

Derivado do alantóide, o cordão umbilical nos camundongos apresenta-se como uma estrutura muito delicada, delgada e translúcida (Fig. 2a), que surge a partir do centro do disco placentário e não se apresenta espiralado, como o cordão umbilical humano. Nos camundongos, o cordão umbilical apresenta duas porções devido à existência de uma placenta saco-vitelínica visceral, além da placenta corio-

alantoidiana. Tanto a porção vitelínica quanto a porção alantoidiana (principal) contém três e dois vasos, respectivamente, suportados por tecido mesenquimal, com a superfície revestida por uma única camada de epitélio amniótico (Fig 2b).

A porção vitelínica é a mais delgada. Partindo do umbilicus e na sua maior extensão apresenta uma artéria e uma veia; esta última se ramifica próximo ao saco vitelino, de modo que nesta região aparecem 3 vasos (uma artéria e duas veias); estes vasos se ramificam profusamente e distribuem-se pela membrana do saco vitelínico.

A porção alantoidiana do cordão é mais a espessa e contém uma artéria e uma veia; também parte do umbilicus e se insere na região central do disco placentário. Estes vasos não se distribuem na parede do saco vitelínico; assim sendo, a estrutura deste cordão alantoidiano corresponde ao cordão clássico de humanos (Kaufmann, 1992).

Fig. 2a Feto de camundongo com 18 dias pós concepção: cordão umbilical (C) e disco placentário (P)

Fig. 2b- Fotomicrografia de cordão umbilical de camundongo (18 dpc) mostrando as duas porções: corioalantoidiana (A) e vitelínica (V). (10x-HE)

Há muito tempo estudam-se os aspectos morfológicos e morfométricos do cordão umbilical associados às afecções gestacionais mais comuns (Qureshi e Jacques, 1994; Weissman et al., 1994; Sun et al., 1995).

O comprometimento do fluxo sanguíneo através dos vasos do cordão umbilical pode provocar efeitos deletérios sobre a saúde do feto e do recém nascido. Em gestações complicadas por pré-eclâmpsia precoce, a área transversal da geléia de Wharton e da veia umbilical estão reduzidas quando comparadas a gestações normais (Raio et al., 2002). Um aumento no diâmetro do cordão umbilical em gestações complicadas por diabetes também foi observado (Weissman e Jakobi, 1997). E um estudo comparando o cordão de fetos normais para idade gestacional com fetos com restrição de crescimento aponta uma redução na área em corte transversal de todos seus componentes (Raio et al., 2003).

Ainda não existe na literatura estudos correlacionado a morfologia do cordão umbilical com a exposição materna a níveis elevados de poluição do ar. Os estudos realizados até o presente enfatizam parâmetros hematológicos do sangue obtido do cordão de recém-nascidos e indicam alterações significativas tais como um aumento na porcentagem de linfócitos “natural killer” (NK) (Dostál et al., 2000), aumento no número de células vermelhas nucleadas (hemácias)(Ziaei et al., 2005), além de aumento nos níveis de carboxihemoglobina e chumbo (Pollak et al., 1976).

No sentido de aumentar nossos conhecimentos sobre os efeitos da poluição do ar sobre a saúde e desenvolvimento fetal, decidimos investigar experimentalmente se a estrutura morfológica dos cordões poderia ser afetada pela

exposição materna durante a gestação aos níveis ambientais de poluição do ar. Para isso realizamos um estudo morfométrico das estruturas dos cordões umbilicais e um estudo imuno-histoquímico dos níveis de peroxidação lipídica e expressão de receptores de endotelina-1 de fetos de mães expostas antes e durante a gestação ao ar não filtrado e de mães expostas em ambos os períodos ao ar filtrado.

2.7 Prováveis mecanismos fisiopatológicos envolvidos

As complicações gestacionais decorrentes da exposição a poluentes são principalmente a mortalidade neonatal e pós-neonatal, baixo peso ao nascer, prematuridade e retardo no crescimento intra-uterino (WHO, 2005). Porém nenhum trabalho até hoje, examinou se alterações na morfologia da placenta estavam relacionadas a estes achados. Embora os mecanismos não estejam esclarecidos, há diversas sugestões sobre como a poluição do ar afeta o desenvolvimento fetal e placentário.

Formação de adutos de DNA: Estudos experimentais mostraram que a exposição transplacentária a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA) tem efeitos adversos sobre o feto (Barbierl et al., 1986; Bui et al., 1986). Os HPAs constituem uma família de compostos caracterizada por possuírem 2 ou mais anéis aromáticos condensados; produzidos por inúmeras fontes tais como a combustão de material orgânico além de vários processos industriais. Os produtos do metabolismo dos HPAs ligam-se ao DNA, formando ligações covalentes que ativam

os processos de reparo do DNA, e a menos que o reparo se dê antes da replicação do DNA, estas ligações podem alterar a função gênica. Em 1999, os adutos de DNA foram apontados como uma explicação fisiopatológica para os efeitos adversos do HPA sobre o feto, foi sugerido (Djemek et al., 2000) com base em experimentos realizados em camundongos (Rutledge, 1997; Generoso et al., 1987) que os HPA, o MP₁₀ e MP_{2.5} reagem com os fatores de crescimento da placenta inibindo o desenvolvimento normal do trofoblasto. Técnicas de biologia molecular que utilizam como biomarcadores os adutos de DNA têm sido usadas para se avaliar o efeito da poluição do ar no desenvolvimento fetal (Perera et al., 1992; Autrup e Vestgaard, 1996; Sram et al., 1999). A susceptibilidade dos fetos é já conhecida, uma vez que existe um aumento de adutos de DNA na placenta e no sangue fetal de mulheres expostas à poluição do ar (Topinka et al., 1997; Perera et al., 1998; 1999).

Tensão de oxigênio: A maioria dos trabalhos sugere que a diminuição na concentração de O₂ ou variações na sua tensão seja o principal fator capaz de provocar alterações tanto na placenta como no feto (Behrman, 1992) Esta diminuição na disponibilidade de oxigênio pode ser decorrente do aumento na viscosidade do sangue (Zondervan et al., 1988; Peters et al., 1997), ou do aumento da concentração de carboxihemoglobina e metahemoglobina (Longo, 1976; 1977; Tabacova et al., 1997). Mulheres gestantes expostas a concentrações aumentadas de SO₂ e NO apresentam um aumento na atividade da lactato desidrogenase (LDH) na placenta, indicando que a glicose está sendo metabolizada pela via anaeróbica, uma vez que a tensão de O₂ deve estar diminuída (Kay et al., 1997; Kaiglova et al.,

2001). A hipóxia tem sido associada à fibrose da placenta (Chen et al., 2003), foram testados os efeitos da hipoxia sobre a produção da matriz extracelular em trofoblastos humanos em cultura e encontrou-se um aumento na síntese fibronectina, colágeno IV e colágeno I na condição de redução da tensão de oxigênio. A importância da oxigenação na angiogênese e diferenciação dos vilos placentários foi revista exaustivamente (Kaufmann et al., 2004), e acredita-se que a poluição afete sua dinâmica provocando uma insuficiência placentária.

Estresse oxidativo: A relação entre poluição e estresse oxidativo é bem conhecida. O estresse oxidativo é um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a capacidade de defesa antioxidante do organismo para neutralizá-los; pode ocorrer pelo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e/ou pela diminuição da capacidade antioxidante. As ROS são radicais livres que podem produzir danos à célula agindo sobre proteínas e lipídios. A placenta apresenta grande produção de óxido nítrico (com função vasodilatadora, imunomoduladora, sinalizadora, etc.); tanto o endotélio fetal como o sinciciotrofoblasto apresentam atividade da enzima eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e sabe-se que a iNOS (forma indutível da NOS) aparece nos macrófagos placentários (células de Hofbauer). O balanço entre as espécies reativas de oxigênio e os mecanismos que controlam sua produção ou inativação é extremamente complexo. Uma das formas de controlar a atividade do óxido nítrico é através da sua inativação pelo ânion superóxido. Inversamente, a atividade do óxido nítrico é prolongada na presença da enzima superóxido dismutase (SOD), que remove o superóxido do local. Porém, quando um tecido é induzido a produzir

simultaneamente óxido nítrico e superóxido por um estímulo inflamatório, sepsis, isquemia/reperfusão, estas duas substâncias reagem formando peroxinitrito, que é um poderoso oxidante para uma variedade de moléculas, além de ter ação citotóxica, inibindo a fosforilação oxidativa, iniciando a peroxidação dos lipídeos e quebra de DNA. A atividade do peroxinitrito pode ser evidenciada facilmente pelos resíduos de nitrotirosina, uma vez que, na sua presença, ocorre a nitrosilação do aminoácido tirosina. Em certas patologias gestacionais, como diabetes, pré-eclampsia, restrição do crescimento intra-uterino ou perda fetal precoce; os níveis de estresse oxidativo estão mais elevados. Estes níveis elevados podem então afetar a função placentária, uma vez que a produção de ROS tem efeitos marcantes sobre a proliferação do trofoblasto, angiogênese, aumento de apoptose no trofoblasto e sobre a diferenciação e reatividade vascular (Myatt e Cui, 2004). Os exames de placentas de mulheres com complicações por pré-eclampsia e diabetes mostraram um aumento da nitrotirosina associado a um acúmulo de matriz extracelular presente no eixo das vilosidades (Myatt e Cui, 2004).

Apoptose: A apoptose ocorre em tecidos placentários normais, o que sugere que, como nos outros tecidos, faça parte do seu desenvolvimento, ocorrendo em todos os tipos celulares da placenta para seu remodelamento; entretanto, as placentas de gestações com restrição do crescimento intra-uterino apresentam aumento na incidência de apoptose. A causa desse aumento não está explicada, mas experimentos *in vitro* mostram que tanto a alta quanto a baixa tensão de oxigênio e TNF- α induzem apoptose do trofoblasto em cultura (Kay et al., 1997;

Kaiglova et al., 2001). A apoptose é um tipo de morte celular que, dependendo do estímulo, pode ser ativada por duas vias: uma mediada por receptores e outra por via mitocondrial. Em ambas, a enzima caspase 3 é uma caspase efetora.

Metais pesados: Entre os metais pesados encontrados no meio ambiente humano o cádmio, o chumbo, o mercúrio, o arsênico, o vanádio e o plutônio são conhecidamente embriotóxicos e teratogênicos.

Em humanos observou-se que a exposição ao chumbo durante a gestação provoca um aumento no risco de ocorrerem abortos, morte intra-uterina e partos prematuros (Saric, 1984; Sallmen et al., 1992). Já a exposição ao cádmio pode provocar anencefalia, anoftalmia, mau desenvolvimento dos pulmões, síndrome do desconforto respiratório, produção de oócitos e embriões com anomalias cromossômicas, diminuir a produção de hCG, inibir a transferência placentária de oxigênio e nutrientes para o feto (Bahttacharya et al., 1988; Levin et al., 1981).

A intoxicação por metais também pode alterar o padrão de fertilidade, a razão sexual, provocar anomalias cromossômicas e desordens no desenvolvimento e no comportamento pós-natal, bem como câncer e morte na infância.

O cádmio é um elemento de elevado potencial tóxico apresentando efeito acumulativo nos organismos, com meia vida na ordem de 10 anos. A placenta humana, assim como a placenta de roedores é uma estrutura sensível à atividade tóxica do cádmio, a acumulação desta substância altera tanto a sua estrutura quanto sua função (Wier et al., 1990). Durante a gestação o cádmio se acumula na placenta, que desta forma atua como uma barreira, porém não como uma barreira

total, de modo a proteger o feto da exposição; isto já foi mostrado em roedores, bovinos e em humanos (Webster, 1988; Smith et al., 1991; Korpela et al., 1986).

Em modelos experimentais (roedores) a exposição ao cádmio durante a gestação provoca fenda palatina, anencefalia, microoftalmia, e mau desenvolvimento dos pulmões e síndrome do desconforto respiratório e desordens do sistema nervoso. Ele também diminui a produção de hCG, inibe a transferência placentária de oxigênio e nutrientes para o feto, necrose placentária e morte fetal (Whelton et al., 1988; Levin e Miller, 1981). O cádmio possui uma permeabilidade placentária limitada, o que significa que altos níveis não alcançam o feto. Porém o fluxo sanguíneo através da placenta diminui devido a alterações histológicas e acúmulo deste metal na placenta, o que levaria a diminuição do fluxo sanguíneo, e do transporte de oxigênio e nutrientes, resultando na morte fetal (Sonowane et al., 1975).

Já chumbo interage com a absorção de cálcio, zinco e ferro nos intestinos, além disso, o chumbo atravessa rapidamente a placenta e acumulam-se nos tecidos fetais durante a gestação. Os efeitos do chumbo sobre a gestação e seus efeitos teratogênicos já são bem estudados (Han et al., 1999; Dearth et al., 2002).

Cerca de 50% do chumbo presente no ar é proveniente do petróleo (Järup, 2003). Pesquisas recentes mostram que a exposição por longo período a baixos níveis de chumbo pode levar a uma diminuição da capacidade intelectual em crianças (WHO, 1995). O chumbo passa livremente através da placenta, resultando em níveis sanguíneos similares tanto na mãe quanto no feto.

Em seu estudo sobre a contaminação de placentas a termo por chumbo em diferentes regiões da Eslovênia Kaiglova et al.(2001), revelou que a contaminação se deve mais a poluição relacionada ao tráfego veicular do que a poluição industrial. Em outro estudo Reichrtová et al. (1998), analisou a distribuição de metais pesados na placenta a termo; e mostrou que o acúmulo se dá nas três regiões placentárias: placa coriônica, na árvore vilosa coriônica e na placa basal. As partículas de níquel e chumbo mostraram uma deposição comum nas diferentes regiões. Na placa coriônica, depósitos de metais foram encontrados no epitélio amniótico bem como no espaço perivascular. Já na árvore vilosa os depósitos foram observados no sincício trofoblasto, nas células de Hofbauer e em todas as células estromais; na placa basal as partículas de metal se concentraram nas células decíduais e no sinciotrofoblasto.

Com relação ao zinco a placenta apresenta uma grande afinidade e por isso a barreira placentária não protege o feto da exposição (Jasmin e Tjalve, 1986; Mas et al., 1985). O níquel afeta o feto diretamente ou indiretamente por perturbar o balanço hormonal; e a exposição materna está associada a um aumento nas falhas implantacionais, (reabsorção fetal e natimortos) (Saunderman et al., 1980; Leonard et al., 1984).

O arsênico é um metalóide largamente distribuído, ocorrendo no solo, água e ar. A produção de energia a partir de combustíveis fósseis e fundição de metais não ferrosos são os processos que mais contribuem para a contaminação do ar, água e solo pelo arsênico. Estudos mostram uma correlação entre a exposição

crônica ao arsênico e um aumento no risco de morte fetal e infantil (Chilvers et al., 1987; Milton et al., 2005).

O vanádio também é liberado no ambiente através da combustão de combustíveis fósseis; as concentrações atmosféricas de vanádio têm aumentado muito devido ao uso deste metal como um catalisador em uma grande variedade de processos industriais. A concentração de vanádio é particularmente elevada em áreas urbanas e regiões próximas a siderúrgicas e refinarias. Menos de 5% do vanádio ingerido é absorvido no trato gastro-intestinal, por outro lado nos pulmões a absorção é de 50% em 30 minutos e de 91% em 4 dias (Hope, 1994; Nriagu e Pacyna, 1988; French e Jones, 1993).

A exposição ambiental a compostos inorgânicos de vanádio, tri e pentavalente, tem sido relacionada à prejuízos em diferentes fases reprodutivas. Morgan e El-Tawil (2003) mostraram experimentalmente em ratos que a exposição (metavanadato de amônio) reduz o número de sítios implantacionais e o número de fetos viáveis, aumenta o numero de reabsorções, fetos mortos e perdas fetais pré e pós-implantacionais.

Alterações vasculares: Diversos estudos têm mostrado um comprometimento da homeostase vascular em decorrência da exposição ao material particulado presente na poluição do ar (Delfino et al., 2005). O feto está sujeito aos efeitos da poluição através da exposição materna e de alterações sistêmicas na mãe possam acarretar o comprometimento do suprimento sanguíneo

ou pela transferência de substâncias nociva e com potencial de influenciar a circulação feto placentária.

Uma série de substâncias vasoativas foi sugerida como influenciadoras da circulação feto-placentária, entre elas as endotelinas (ET). Com base na observação de que durante a gestação há um aumento nos níveis de ET e de que o endotélio dos vasos umbilicais também sintetiza este peptídeo, acredita-se que este peptídeo está envolvido na regulação do tônus vascular da região feto-placentária (Nisell et al., 1990; Wilkes et al 1990; Fried e Lui, 1994 Haegerstrand et al., 1989; Hemsén et al., 1991).

As endotelinas (ETs) são potentes vasoconstritores que exercem seus efeitos biológicos ligando-se a dois diferentes receptores, o receptor A (ETA) e o receptor B (ETB) (Arai et al., 1990; Sakurai et al., 1990). A endotelina ao ligar-se aos receptores (A e B) presentes nas células musculares lisas vasculares media a vasoconstrição, por outro lado ao se ligar aos receptores B no endotélio media a vasodilatação através da liberação de fatores de dilatação (Hirata et al., 1993; Davenport e Maguire, 1994).

O fluxo sanguíneo da placenta para o feto é determinado pela diferença entre a pressão sanguínea da artéria aorta e a pressão da veia umbilical, que por sua vez depende do tônus vascular deste vaso. E trabalhos recentes mostram que a veia umbilical está apta a ajustar o tônus vascular em resposta a tensão de oxigênio local. Como os vasos umbilicais não apresentam inervação, mecanismos locais de regulação do tônus vascular são de particular importância. (Ehinger et al., 1968; Goodwin, 1968; Mildemberger et al., 1999; Sexton et al., 1996)

Diferentes estudos mostram que diferenças regionais na densidade relativa de receptores e níveis de endotelina influenciam o fluxo sanguíneo e contribuem para uma hemodinâmica feto-placentária anormal em gestações com complicações (Rutherford et al., 1993; MacQueen et al. 1993; Hartikainen-Scorri et al., 1991; Kohen et al., 1997). MacQueen et al. (1993) encontrou níveis elevados de endotelina em cordões de fetos com Doppler antenatal anormal. Em outro estudo (Hartikainen-Scorri et al., 1991) mostrou concentrações altas de ET1 na artéria umbilical de fetos de gestações complicadas por restrição do crescimento severa. Ambos os estudos citados tratam de gestações afetadas também por hipertensão materna ou pré-eclampsia. Kohen et al. (1997) demonstraram que há uma maior expressão dos receptores A e B nos vasos dos vilos placentários em placentas de mulheres com gestações complicadas por IUGR, porém com Doppler normal.

Acredita-se que a disfunção endotelial pode ser resultado de um aumento no estresse oxidativo. O processo de peroxidação lipídica, iniciado pela reação de radicais livres com ácidos graxos poliinsaturados é utilizado como um indicador da força oxidativa. Quando o estresse oxidativo ocorre, os níveis de peroxidação lipídica aumentam elevando a geração de radicais livres que promovem uma série de eventos que alteram a secreção de substâncias (Muller et al., Hubel et al., 1989, 1999; Deneke e Fanburg, 1989; Davidge, 1998) vasoativas tais como as endotelinas. Scalera et al. (2002) demonstraram que níveis aumentados de endotelina-1 estão associados à elevada nível de peróxidos lipídicos.

Diversos trabalhos mostram uma expressão aumentada tanto do receptor A quanto do B em vasos em diversas patologias e decorrentes da exposição a

substâncias tóxicas, tais como o cigarro. No caso de hipóxia prolongada, observa-se um aumento da expressão do receptor A nos vãos do corpo carotídeo (Rey et al., 2007; Chen et al, 2000, 2002; Xu et al., 2006)

Sinergismo de mecanismos: Os estudos dos efeitos do fumo no desenvolvimento placentário são abundantes e demonstram que, na realidade, todos estes mecanismos estão presentes simultaneamente causando danos teciduais e fisiológicos observados. Certos autores (Mohorovic, 2003; 2004), consideram a inalação de substâncias tóxicas (originadas da combustão de carvão) decisiva na ocorrência de partos prematuros e recém nascidos de baixo peso devido a um sinergismo metabólico de NO_x e SO_2 que resultam em um elevado estresse oxidativo permanente. Quando inalado, o NO_x entra na circulação materna pelos capilares alveolares e oxida a hemoglobina, gerando metahemoglobina, que por sua vez, provoca hipóxia, inibição do sistema antioxidante e desequilíbrio na produção de ROS, acarretando uma série de outros efeitos negativos sobre os tecidos. O monóxido de carbono inalado também se liga fortemente a hemoglobina formando a carboxihemoglobina (COHb), impedindo o transporte oxigênio e também pode se ligar a citocromo oxidase, o que resulta em uma menor capacidade de utilização do oxigênio pelas células.

O desenvolvimento normal da placenta é regulado grandemente pela tensão adequada de oxigênio; estudos experimentais com animais gestantes expostos à fumaça do cigarro mostram que a hipóxia causada pelo fumo afeta a proliferação e diferenciação do trofoblasto, alterações na vascularização e no

desenvolvimento dos vilos placentários, na quantidade de pericitos e na composição da matriz extracelular (Genbacev et al 2003; Rocha et al., 1998). As alterações encontradas na vascularização da placenta parecem ser decorrentes de mecanismos compensatórios que auxiliam no aumento do fluxo sanguíneo para o embrião. Além disso, sabe-se que o fumo altera os níveis placentários de eNOS, predispondo as células do citotrofoblasto a sofrerem apoptose (Genbacev et al 2003).

3. JUSTIFICATIVA

Tendo em vista que:

(1) o ar atmosférico de São Paulo é poluído o bastante para desencadear lesões patológicas de diferentes sistemas, inclusive diminuindo a eficiência reprodutiva,

(2) há evidências experimentais, clínicas e epidemiológicas que relacionam a exposição à altas concentrações das substâncias tóxicas presentes na poluição atmosférica com alterações gestacionais em animais e seres humanos, e

(3) não existem trabalhos experimentais que tenham testado os efeitos da poluição do ar ambiental sobre o desenvolvimento placentário, o cordão umbilical, a reserva folicular e o ciclo estral.

Este trabalho propõe o estudo completo da eficiência reprodutiva e das modificações estruturais placentárias e de cordões umbilicais relacionadas à exposição de camundongos gestantes ao ar atmosférico de São Paulo, levando em consideração os diferentes períodos de exposição.

4. OBJETIVOS

- (1) Avaliar a ciclicidade estral de fêmeas nulíparas
- (2) Quantificar a reserva folicular
- (3) Avaliar os seguintes parâmetros reprodutivos: índices de acasalamento, fertilidade e gestação, morte fetal, perdas pré e pós-implantacionais.
- (4) Determinar em qual etapa da gestação a exposição ao ar ambiental é mais prejudicial para redução do peso fetal;
- (5) Determinar as possíveis alterações das estruturas placentárias, com ênfase no componente vascular e na superfície de troca materno-fetal;
- (6) Determinar possíveis alterações da estrutura do cordão umbilical.
- (7) Investigar a presença de possíveis mecanismos fisiopatológicos (estresse oxidativo) nas placentas e cordões umbilicais associados à exposição.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O modelo animal escolhido foi o camundongo, uma que vez os roedores têm placenta do tipo hemocorial, como os humanos. A exposição dos animais gestantes foi realizada em câmaras de exposição, com e sem filtros para elementos constituintes da poluição. A concentração dos poluentes ($MP_{2,5}$ = material particulado $\leq 2,5\mu m$) foi determinada gravimetricamente, utilizando impactadores Harward (Air Diagnostics, Harrison, ME) sob uma taxa de fluxo de $10 L.m^{-1}$ equipados com filtros de policarbonato; os resultados sendo expressos em $\mu g/m^3$. Ainda utilizando os mesmos filtros, análises elementares (Na, Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, V, Fe, Ni, Cu, Zn and Pb) foram realizadas com auxílio de um espectrofotômetro de fluorescência de raio X (Shimadzu EDX 700). Já concentrações de CO, NO₂ e SO₂ foram obtidas da estação de monitoramento da CETESB, localizada a 100m das câmaras de exposição.

Foram avaliados tanto parâmetros de eficiência reprodutiva relacionados ao casal como aqueles relacionados especificamente às fêmeas.

A avaliação do ciclo estral e da reserva folicular, dos índices de acasalamento, fertilidade e gestação foi realizada em dois grupos: fêmeas/casais expostos e fêmeas/casais não expostos.

Já os parâmetros relacionados ao desenvolvimento da gestação, tais como perdas fetais, número de fetos vivos e mortos, entre outros foram avaliados em 4

grupos distintos para verificar se somente a exposição pré-concepcional materna seria um fator de influência nos resultados

Para se averiguar em qual fase da gestação existe maior susceptibilidade à poluição (avaliada pelo peso ao nascer), grupos distintos de fêmeas foram expostos em diferentes idades gestacionais, de acordo com as fases de desenvolvimento placentário: 1º. ao 5º. dia: fase de nutrição histotrófica; 6º. ao 10º. dia: fase da placenta vitelínica; 11º. ao 19º. dia: fase da placenta cório-alantoidiana, totalizando 10 grupos distintos.

Ao final da gestação os animais foram sacrificados. Neste momento obtivemos os seguintes parâmetros de eficiência reprodutiva: número de corpos lúteos, peso fetal, medidas da placenta, número de fetos vivos, mortos, reabsorvidos e de falhas na implantação. Todas as placentas e cordões umbilicais foram coletados. Uma placenta por fêmea foi congelada para estudos futuros.

As outras placentas foram fixadas e processadas para realização de um estudo estereológico para determinação de parâmetros morfométricos (volume absoluto da zona do labirinto, da zona juncional e da decídua; fração de volume do espaço sangüíneo materno, fração de área de superfície dos capilares fetais).

Os cordões assim como as placentas foram fixados e processados para realização de um estudo estereológico.

Após a coleta dos órgãos que foram avaliados nesse projeto, os demais órgãos da mãe (fígado, rim pulmão, coração, ovários) e os fetos foram fixados e guardados para análises posteriores.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Exposição:

Foi realizada no jardim da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP) em câmaras de exposição. A FMUSP está localizada na intersecção da Rua Teodoro Sampaio com a Av. Dr. Arnaldo. Muito próximo ao local das câmaras de exposição (100m) existe uma estação de monitoramento da CETESB que registra continuamente os níveis de PM_{10} , NO_2 , CO e SO_2 . Foram usadas 2 câmaras montadas lado a lado (Fig.3): a primeira recebendo ar ambiente (câmara poluída), a segunda recebendo ar filtrado (câmara limpa). A entrada de ar ocorre na base do cilindro, sendo distribuído uniformemente, através de furos, a um fluxo de 50 l/seg e exaurido pelo topo por uma grande abertura. Esta câmara é um sistema normobárico, onde a pressão interna não excede 3cm de H_2O . Na câmara limpa serão colocados filtros: o primeiro para as partículas grandes o segundo para partículas finas (Purafil, São Paulo, modelo TB e modelo JFL-90); e o último para adsorver substâncias químicas. No interior das câmaras, os animais foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura e umidade relativa do ar, (recebendo água e ração *ad libitum*).

6.2 Grupos experimentais

Foram avaliados grupos (10 animais por grupo) de camundongos da segunda geração (G2) de animais que acasalaram e cresceram dentro das câmaras de exposição recebendo ar filtrado (F) ou não filtrado (nF).

A primeira geração (G1) foi obtida acasalando-se animais provenientes do Biotério Central da Faculdade da Medicina da Universidade de São Paulo. Para tanto, camundongos com 20 dias de idade foram mantidos separadamente na câmara filtrada (10 fêmeas e 10 machos) e na câmara não filtrada (30 fêmeas e 30 machos) até atingir a idade reprodutiva (60 dias). Neste estágio, casais foram formados e mantidos separadamente em caixas individuais. A partir das ninhadas obtidas, machos e fêmeas foram mantidos em suas respectivas câmara por 21 dias. Após o desmame, os filhotes foram separados das mães e agrupados em caixas de machos e fêmeas contendo 5 animais cada uma. Alcançada a idade reprodutiva, 10 casais na câmara filtrada e 30 casais na câmara não filtrada foram formados para produzir a segunda geração (G2). Novamente após o desmame os animais foram separados e atingida a idade reprodutiva foram destinados a diferentes protocolos de exposição de acordo com o parâmetro reprodutivo a ser avaliado. Um esquema do protocolo de reprodução dos animais deste estudo pode ser visto na figura 4. A segunda geração foi escolhida para evitar que a exposição pré-natal não fosse excluída, principalmente no caso dos animais da câmara filtrada

Figura 4- Representação esquemática do protocolo de criação dos animais experimentais. As setas indicam que os camundongos da segunda geração (G2) passaram por exposições diferenciadas após atingirem a idade reprodutiva para a avaliação dos diversos parâmetros reprodutivos.

6.3 Avaliação do Ciclo Estral

Para a verificação de alterações na ciclicidade estral, vinte fêmeas nulíparas (G2 com 12 semanas de idade), aleatoriamente selecionadas em cada uma das câmaras, foram submetidas à coleta de lavados vaginais diários durante um período de duas semanas, o que nos forneceu dados sobre 3 ciclos, considerando ciclos normais de 4 dias (Morissey et al., 1988a; 1988b). Com o objetivo de se realizar uma análise quantitativa, definimos a ciclicidade estral como sendo o número de eventos da passagem do proestro para o estro (considerando-se ciclos normais, o esperado seriam 3-4 passagens durante o período de 2 semanas, uma vez que cada ciclo dura cerca de 4 dias); além disso, avaliamos o número de dias em estro exibido pela fêmea durante todo o período. Os lavados vaginais foram avaliados por microscopia de luz para classificação do estágio do ciclo em que a fêmea se encontrava, com

base na preponderância de células epiteliais cornificadas, células epiteliais nucleadas e leucócitos (Quadro 1). Para promover o ciclo estral, caixas com machos foram mantidas nas câmaras de exposição (King et al., 1993).

Quadro 1 – Classificação dos estágios do ciclo estral de acordo com a citologia vaginal (adaptada de Nelson et al., 1982.).

Fase do ciclo	Células epiteliais superficiais	Células epiteliais nucleadas	Leucócitos
Diestro	ausente	≤10%	≥60%
Proestro	ausente	≥60%	≤10%
Metaestro	≥60%	≤20%	≥20%
Estro	≥90%	ausente	ausentes

6.4 Contagem dos Folículos Ovarianos

A avaliação da toxicidade ovariana nas fêmeas expostas à poluição do ar foi realizada estimando-se o número de folículos ovarianos. Para tanto, cinco fêmeas (G2) nulíparas na fase de estro, provenientes de cada uma das câmaras (filtrada e não filtrada) foram sacrificadas por meio de uma injeção intraperitoneal de pentobarbital sódico (200 mg.kg⁻¹ peso corporal). A cavidade abdominal foi aberta e os ovários removidos, o excesso de gordura dissecado e fixados por imersão em paraformaldeído 4% por 24 hs. Após a fixação, foram desidratados em solução crescente de álcool etílico e incluídos em resina de glicometilacrilato segundo orientações do fabricante (Technovit 7100, Ax-lab, Copenhagen, Denmark).

A análise morfométrica dos folículos foi realizada segundo Bolon et al. (1997). Resumidamente, os blocos foram cortados seriadamente com 10 µm, e

todos os cortes coletados em sequência em lâminas e corados pelo método hematoxilina-eosina. Os folículos foram categorizados em 4 classes: pequenos, em desenvolvimento, antrais e pré- ovulatório. Os folículos pequenos incluem os folículos primordiais (com uma camada de células escamosa na granulosa) e os folículos primários (com uma camada de células cúbicas na granulosa). Os folículos foram classificados como em desenvolvimento se apresentavam mais que uma camada de células na granulosa e como antral se houvesse a presença de um antro. Os folículos pré-ovulatórios foram identificados pela presença de uma rima de células do cumulus ao redor do oócito.

Os cortes foram analisados, começando-se com o primeiro, e as contagens foram feitas em cada 10º corte subsequente, o que garante uma amostra não randômica de 10%. Os folículos pré-ovulatórios foram estimados separadamente por meio de contagem exata usando-se todas as lâminas

6.5 Avaliação da Capacidade Reprodutiva

Para verificar se a exposição poderia influenciar a capacidade reprodutiva dos casais, nós examinamos 4 grupos de animais G2 (20 casais por grupo) que acasalaram nas câmaras filtrada e não filtrada.

Os grupos foram assim definidos:

-Grupo F1: composto por animais que cresceram, acasalaram e produziram a gestação na câmara filtrada.

-Group F2: composto por animais que cresceram na camara filtrada e acasalaram e produziram a gestação na câmara não-filtrada

-Grupo nF1: composto por animais que cresceram na câmara não-filtrada e acasalaram e produziram a gestação na câmara filtrada

-Grupo nF2: composto por animais que cresceram , acasalaram e produziram a gestação na câmara não-filtrada.

O 1º. dia de gestação foi considerado com base na observação de um plug vaginal e pela visualização de espermatozóides no lavado vaginal.

6.6 Desfechos reprodutivos relacionados ao casal

Os seguintes parâmetros e índices foram determinados de acordo com o EPA-Guideline for Reproductive Risk Assessment (EPA, 1996) para avaliar a capacidade reprodutiva dos animais G2 nos grupos F1 e nF2:

(a) **Índice de acasalamento**= (nº fêmeas com presença de plug / nº de casais coabitando) x 100

(b) **Índice de fertilidade**= (nº casais prenhes / nº casais não prenhes) x100

(c) **Tempo necessário para acasalar** = tempo (nº dias) necessário para que cada casal copule após o início da coabitação (avaliado pela presença do plug vaginal e de espermatozóides no lavado).

(d) **Índice Gestacional**=(nº fêmeas que pariram/ nº de fêmeas que apresentaram evidência de gestação) x 100

6.7 Desfechos gestacionais

Após completar o período de exposição todas as fêmeas dos 4 grupos foram sacrificadas no 18º dia da gestação. Utilizamos anestésicos inalatórios (isoflurane) para pré-anestesia e pentobarbital sódico por injeção intraperitoneal (200 mg / kg de peso corpóreo).para a eutanásia de acordo com as recomendações do painel de eutanásia da American Veterinary Medical Association (AVMA, 2000) .

A parede abdominal foi aberta imediatamente, os vasos uterinos ligados e o útero cuidadosamente removido e examinado para a determinação dos sítios implantacionais, reabsorções, fetos vivos e mortos. Os fetos, as placentas (juntamente com a decídua subjacente) e cordões umbilicais foram dissecados e pesados (Fig. 5). Uma placenta selecionada randomicamente de cada ninhada foi dissecada para a remoção das membranas extra-embrionárias e fixada em paraformaldeído 4% por imersão por 24hs e transferida para etanol 70% para estudo da morfologia funcional. Também foram anotados os números de corpos lúteos presentes nos ovários observados sob lupa estereoscópica.

O índice de perdas pré e pós-implantacionais foram calculados de acordo as fórmulas (EPA, 1996):

$$(a) \text{ Índice de perdas Pré-implantacionais} = (Ncl - Nis) \times 100 / Ncl$$

onde Ncl é o número de corpos lúteos e Nis o número de sítios implantacionais.

$$(b) \text{ Índice de perdas Pós-implantacionais} = (Nis - Nftp) \times 100 / Nis$$

onde Nftp é o número de fetos a termo.

6.8 Avaliação estereológica e morfométrica da placenta e do cordão

umbilical

A estereologia é um método bem estabelecido para gerar quantidades tridimensionais, como volume, áreas de superfície e comprimento de tecidos complexos a partir de cortes histológicos bidimensionais. Para cada órgão e para cada parâmetro analisado foram realizados procedimentos diversos:

6.8.1 Placenta

Em nossa análise utilizamos uma adaptação do método descrito por COAN et al. (2004) com material incluído em parafina e resina. A avaliação da morfologia funcional da placenta foi conduzida nos quatro grupos citados anteriormente (F1, F2, nF1 e nF2). Sete placentas (de ninhadas distintas) de cada grupo foram examinadas. As placentas fixadas foram pesadas (g) e amostradas utilizando-se um método randômico sistemático e uniforme em multi-estágio [systematic uniform random (SUR) design] (Mayhew, 2006; 2008). O peso da placenta foi convertido em volume (V_{plac} , cm^3) dividindo-se pela densidade do tecido, considerada $1,05 \text{ g.cm}^{-3}$ (Mayhew et al, 2003).

Figura 5- Em (a) aparece o animal anestesiado; em (b) observa-se a abertura da cavidade abdominal e exposição do útero; foram avaliados número de fetos vivos, anomalias (c.1) e fetos mortos (c.2). A ilustração (d) mostra a ligadura dos vasos sangüíneos uterinos para que não ocorra perda do sangue placentário na remoção do útero; (e): útero removido da cavidade abdominal para dissecação em solução fixadora; (f): remoção da parede uterina; (g) e (h): separação do feto, placenta e cordão umbilical.

As placentas foram seccionadas em fatias de 2mm perpendiculares à placa coriônica (definida como o plano de referência horizontal) para geração de grupos de cortes verticais (Baddeley et al., 1986). Este protocolo de amostragem tem a virtude de randomizar o local de secção e orientação, sendo ambos necessários para se estimar as áreas de superfície juntamente com o volume dos tecidos (Mayhew, 2006; Howard e Reed, 2005). Dois conjuntos de cortes SUR verticais foram obtidos por placenta e 2-3 fatias amostradas em cada conjunto. O primeiro conjunto foi incluído em parafina para se estimar os volumes dos diferentes compartimentos placentários (decídua, labirinto, zona juncional e placa coriônica). O outro conjunto de fatias foi seccionado novamente perpendicularmente ao plano de referência em tiras de 2mm. Uma amostragem randômica uniforme e sistemática (SUR) destas tiras foi realizada. As tiras selecionadas foram rotacionadas em seu eixo maior (eixo vertical) e incluídas em resina de glicometilacrilato (Technovit 7100, Ax-lab, Copenhagen, Dinamarca) para análise detalhada dos volumes e superfícies das estruturas do labirinto (Fig.6). A análise estereológica foi realizada ao microscópio óptico. O objetivo foi estimar a composição volumétrica da placenta juntamente com as áreas de superfície dos espaços sanguíneos maternos e capilares fetais. Outras quantidades (calibre dos vasos, média aritmética da espessura e a capacidade difusional do oxigênio total e massa específica da barreira intervacular) foram derivadas secundariamente das estimativas primárias.

Figura 6- Amostragem das placentas: (a) randomização da direção do corte com auxílio de “orientator clock”.; (b) e (c): obtenção de fatias de 2mm paralelas ao eixo vertical (considerando a placa coriônica como eixo horizontal); (d) seleção de duas fatias para inclusão em parafina (*) e duas para historresina (#); (e) as fatias destinadas a inclusão em resina são novamente fracionadas em tiras de 2mm; (f) seleção sistemática (↓) de tiras para inclusão em historresina; (g) blocos de resina e parafina prontos (face de corte).

Quantidades primárias (volumes e superfícies)

Os blocos de parafina foram seccionados exaustivamente em cortes de 5 µm e aproximadamente 8 fatias, espaçadas igualmente, foram coletadas em laminas de vidro e coradas segundo método padrão de hematoxilina eosina. Os cortes foram fotografados utilizando-se uma objetiva de pequeno aumento (2,5X) de maneira que a amostra toda pudesse ser vista. A fração de volume (V_v) de cada compartimento placentário [decídua basal (Db), zona juncional (Jz) e labirinto (Lab) e placa coriônica (Cp)] foi estimado pelo método de contagem de pontos (Howard e, Reed, 2005).

Para isto um sistema teste de com espaçamento entre pontos de = 0,632 mm e área de 0,4 mm² associada a cada ponto foi sobrepostos nos cortes orientados verticalmente. O programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)^b foi utilizado para a realização das contagens e geração dos sistemas teste (Fig. 7). Os pontos incidentes sobre as diferentes zonas placentárias (P_{zone}) e sobre a placenta como um todo (P_{plac}), foram contados e a fração de volume (V_v) das zonas estimadas usando-se a seguinte equação (1):

$$(1) \quad \text{Est } V_v = \Sigma P_{zone} / \Sigma P_{plac}$$

onde ΣP_{zone} e ΣP_{plac} são a soma de todos pontos em todos os campos e cortes de cada placenta.

^b **ImageJ** (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/index.html>)

Subseqüentemente, o volume total de cada zona da placenta (V_{zone}) foi estimado multiplicando-se a fração de volume (V_V) pelo volume da placenta correspondente (V_{plac}) segundo a fórmula (2):

$$(2) \quad \text{Est } V_{zone} = V_V \times V_{plac}.$$

A partir dos blocos de resina, uma série de aproximadamente 4 cortes, distantes igualmente e verticalmente orientados com espessura de 3 μm foi obtida e corada com azul de toluidina 1%. Cada corte continha amostra de 3 a 4 tiras. O volume total de cada sub-compartimento do labirinto (capilares fetais, trofoblasto e espaços sanguíneos maternos) também foi estimado pelo método de contagem de pontos (espaço entre pontos 54 μm , área por ponto de 2916 μm^2). Doze campos selecionados randomicamente dentro do labirinto foram fotografados utilizando uma objetiva de 40x. Novamente o volume total de cada sub-compartimento do labirinto foi obtido indiretamente multiplicando-se a fração de volume pelo volume total do labirinto obtido nos cortes de parafina.

As densidades de superfície dos espaços sanguíneos maternos e dos capilares fetais foram obtidas utilizando-se um sistema teste de arcos ciclóides sobrepostos nos mesmos campos utilizados na análise dos componentes do labirinto, de modo que seu eixo vertical correspondesse com a direção vertical dos cortes de tecido (Fig. 8) (Coan et al., 2004; Baddeley et al., 1986). As intersecções entre os arcos testes e os limites dos espaços sanguíneos maternos ou capilares fetais foram contados e somados em todos os campos para cada placenta. A

equação (3) que se segue foi usada para se estimar a densidade de cada superfície (S_V) no volume do labirinto:

$$(3) \quad \text{Est } S_V = 2 \times \Sigma I_{\text{surf}} / (l_p \times \Sigma P_{\text{lab}})$$

onde ΣI_{surf} é o número total de intersecções entre os arcos ciclóides e a superfície do compartimento, l_p é o comprimento da linha teste (42.4 μm na escala da imagem) associada a cada ponto e ΣP_{lab} é o número total de pontos que incidem sobre o compartimento de referência (neste caso o labirinto).

As áreas de superfície absolutas (S_{surf}) de cada compartimento (espaços sanguíneos maternos ou capilares fetais) foram obtidas multiplicando-se a densidade de superfície (S_V) pelo volume do labirinto (V_{lab}) da respectiva placenta, segundo a equação (4):

$$(4) \quad \text{Est } S_{\text{surf}} = S_V \times V_{\text{lab}}.$$

Quantidades derivadas (espessura, diâmetro e condutância de difusão)

Uma estimativa da média aritmética da espessura da barreira intervacular (T_a) foi derivada do volume do trofoblasto (V_{tro}) e das áreas de superfície do espaço sanguíneo materno (S_{mbs}) e capilares fetais (S_{fcap}), utilizando-se a fórmula (5):

$$(5) \quad \text{Est } T_a = 2 \times V_{\text{tro}} / (S_{\text{mbs}} + S_{\text{fcap}}).$$

Este estimador da T_a gera valores maiores que aqueles obtidos a partir de medidas obtidas por interceptos lineares através da barreira intervacular.

O calibre “diâmetro” dos espaços sanguíneos maternos e capilares fetais foi estimado a partir dos volumes totais e superfícies correspondentes. Por exemplo, assumindo-se que os capilares fetais representam uma rede de cilindros circulares uniformes, o diâmetro dos capilares (D_{fcap}) é dado pela equação (6):

$$(6) \quad \text{Est } D_{\text{fcap}} = 4 \times V_{\text{fcap}} / S_{\text{fcap}}$$

onde V_{fcap} é o volume total e S_{fcap} a superfície total dos capilares fetais.

Entretanto, este modelo representa melhor os capilares fetais que os espaços sanguíneos maternos (que são espaços irregulares), os diâmetros resultantes são apenas aproximações, pois se assume que os vasos e espaços sanguíneos são circulares em corte transversal e uniformes ao longo de sua extensão.

Mas o objetivo principal deste trabalho foi entender se diferenças nos volumes vasculares poderiam ser decorrentes de alterações nos calibres.

Fig.7- Exemplo da aplicação do sistema teste de pontos utilizando o programa de Análise de imagens IMAGE J para avaliação dos volumes dos compartimentos placentários.

Fig.8 – Aplicação do sistema teste de arcos ciclóides para estimar as áreas de superfícies dos capilares fetais (seta vermelha) e espaço sanguíneo materno (seta branca).

A condutância de difusão total do oxigênio ($\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$) da barreira intervacular é determinada por uma série de quantidades estruturais e físico-químicas que caracterizam as dimensões físicas e propriedades fisiológicas dos componentes teciduais interpostos entre os vasos fetais e o sangue materno (Coan et al., 2004; Mayhew et al., 1993). A medida da condutância de difusão (D_{ivb}) desta membrana pode ser obtida a partir de estimativas das áreas de superfície e média harmônica da espessura (Th_{ivb}) utilizando-se a relação (7):

$$(7) \quad \text{Est } D_{ivb} = K \cdot (S_{mbs} + S_{fcap}) / 2 \cdot Th_{ivb}$$

onde K representa o coeficiente de difusão de Krogh e para o qual nós adotamos o valor de $17.3 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$ (Coan et al., 2004).

A média harmônica difere da média aritmética por dar mais peso a regiões finas da membrana intervacular, ou seja, para regiões através das quais a difusão ocorre mais eficientemente. Neste estudo, nós aproximamos a D_{ivb} utilizando a média aritmética (Ta) ao invés da média harmônica da barreira intervacular.

Estudos recentes também conduzidos em camundongos e ratos (Coan et al., 2004) sugerem que, quando estimada a partir do comprimento de interceptos ortogonais, a média aritmética é aproximadamente 7-10% maior que da média harmônica após o 16,5º dia da gestação.

A condutância massa-específica ($\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) foi definida simplesmente pela divisão da D_{ivb} pelo peso do feto. Para avaliar as distorções

decorrentes do processamento do tecido nos diferentes grupos, o diâmetro médio de hemácias foi utilizado como padrão interno de calibração.

Com o auxílio do Programa ImageJ [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>], os aumentos lineares foram calibrados fotografando-se uma escala micrométrica como padrão externo. Este software foi utilizado para gerar e sobrepor os sistemas teste e realizar as contagens (Papadopoulos et al., 2007).

6.8.2 Cordão umbilical

Cinco cordões selecionados aleatoriamente e de ninhadas distintas dos grupos F1 e nF2 foram utilizados para este estudo. Os cordões foram pesados, seu comprimento anotado e processados rotineiramente para inclusão em parafina. Resumidamente, as amostras fixadas foram desidratadas em série crescente de alcoóis, diafanizados em xilol e embebidos em parafina orientados de maneira que cortes transversais fossem obtidos (Fig. 9). Cortes seriados de 5 µm foram amostrados sistematicamente e uniformemente, de modo que a cada 500µm (ou a cada 100 cortes) um corte juntamente com o corte seguinte fossem coletados, totalizando aproximadamente 11-15 cortes por cordão. Também foram coletados cortes em lâminas silanizadas para estudo imunoistoquímico qualitativo. Os cortes obtidos para o estudo morfológico foram desparafinizados e corados com hematoxilina eosina e examinados em microscópio de luz.

Os volumes totais (do cordão, dos vasos, do mesênquima, das artérias e veias vitelínicas e alantoidianas) foram estimados aplicando-se o Método de Cavalieri utilizando-se um sistema teste de pontos (Gundersen e Jansen, 1987).

Para se estimar os volumes absolutos dos cordões (V_{uc}), um sistema de 108 pontos (área associada ao ponto = $10000\mu m^2$) foi sobreposto às secções e estas observadas com uma objetiva de 20x, que permitiu a visualização completa da amostra. Os pontos incidentes sobre a estrutura foram contados e o princípio de Cavalieri aplicado de acordo com a seguinte fórmula (8):

$$(8) \quad V_{uc} = t \times a(p) \times \sum Pts$$

onde t é o comprimento total do cordão (número de cortes multiplicado pela espessura dos cortes), $a(p)$ = a área associada ao ponto, e $\sum Pts$ = somatória de pontos incidentes no cordão umbilical como um todo.

Para os demais parâmetros (volume da luz e da parede das artérias e veias umbilicais) foram estimadas a fração de volume (V_v) de cada compartimento vascular pelo método de contagem de pontos, usando-se a seguinte equação(9):

$$(9) \quad \text{Est } V_v = \Sigma P_{Ucstruc} / \Sigma P_{Ucves}$$

onde $\Sigma P_{Ucstruc}$ é a soma do número de pontos incidentes na luz ou parede do vaso em estudo e ΣP_{Ucves} é a soma do número de pontos incidentes sobre a totalidade do vaso em todos os campos e cortes de cada cordão. Para estas frações de volume considerou-se como espaço referência o volume total do vaso em questão.

Subseqüentemente, o volume total de cada estrutura do cordão umbilical ($V_{Ucstruct}$) foi estimado multiplicando-se a fração de volume (V_v) pelo volume do cordão (V_{Uc}), utilizando a seguinte fórmula (10):

$$(10) \quad V_{Ucstruct} = V_v \times V_{Uc}$$

Neste caso, utilizamos um sistema teste de pontos com área referente ao ponto de $800\mu m^2$ (Howard e, Reed, 2005).

Também por meio de contagem de pontos foi estimada as áreas seccionais médias do cordão, dos vasos umbilicais e da luz dos vasos; e a partir destas calculou-se a razão entre a área da luz e parede de todas as artérias e veias umbilicais (Lemos et al., 2006). Para estimar a espessura da parede dos vasos umbilicais, consideramos os vasos como estruturas cilíndricas perfeitas e a partir da

área seccional média do vaso e de sua luz estimamos a espessura média da parede a partir das áreas e raios aplicando-se a seguinte fórmula (11):

$$(11) \quad \text{Esp} = \left[\frac{V(\text{Atot})}{\pi} - \frac{V(\text{Aluz})}{\pi} \right] = \text{raio da Atot do vaso} - \text{raio da Aluz}$$

Onde Atot é a área seccional total do vaso e Aluz a área seccional da luz do vaso.

O programa Image J também foi utilizado para a realização das contagens e geração dos sistemas teste.

6.8.2.1. Determinação do estresse oxidativo na parede dos vasos umbilicais

Entre os produtos da peroxidação lipídica, o 15-F2t-isoprostano tem sido utilizado como um indicador de estresse oxidativo (Cracowski et al., 2000; Nonaka-Sarukawa et al., 2003; Pratico et al., 1997).

Quantificação do 15-F2t-isoprostano e Receptor de endotelina A

Para o estudo imunoistoquímico, os cortes recolhidos em laminas silanizadas foram desparafinados e hidratados. A hidratação foi realizada em banhos de alcoóis em concentração decrescente e finalizada em banho de água deionizada. A peroxidase endógena foi bloqueada com banhos em água oxigenada 10 volumes por 15 minutos (5 vezes) e depois lavados em água corrente e PBS. A recuperação antigênica foi realizada aquecendo-se os cortes em panela de pressão, imersos em tampão citrato de sódio (ETAR) ou utilizando-se método da tripsina (Isoprostano).

As reações inespecíficas foram bloqueadas com banho de leite desnatado 6% por 30 minutos. As lamínas foram incubadas em câmara úmida por 18 hs com o anticorpo primário anti 15-F2t-isoprostano de cabra (IS-20, Oxford Biomedical) [Titulação 1:500] ou anticorpo primário anti ETAR (receptor de endotelina-A) de cabra (sc-21194, Santa Cruz Biotechnology) [Titulação 1:150]; Após a lavagem em PBS, os cortes foram incubados com anticorpo secundário biotilado (Vetor- IgG goat) durante 1 hora à 37°C. Após lavagem em PBS, procedeu-se a incubação como complexo conjugado a peroxidase (Dako L120SAB+) e, finalmente a reação foi revelada com diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos. Os núcleos foram evidenciados por contra-coloração com hematoxilina. Os controles negativos foram preparados omitindo-se o anticorpo primário, e em seu lugar foi utilizado albumina fetal bovina.

Análise das imagens

A densidade de área marcada positivamente para 15-F2t-isoprostano e para ETAR na parede dos vasos umbilicais (artéria e veias alantoidianas e vitelínicas) foi avaliada utilizando-se análise de imagem. As medidas foram realizadas com auxílio do software Image J a partir de fotomicrografia obtidas dos cortes dos cordões. Dois cortes foram avaliados por cordão, e as fotomicrografias foram obtidas com objetiva 40x de maneira que o diâmetro total do vaso pudesse ser visualizado. A fração de área da parede vascular marcada positivamente foi calculada como a razão entre a área positiva para 15-F2t-isoprostano ou ETAR e a área total da parede do vaso em questão. Os resultados foram expressos em porcentagem.

6.9 Avaliação da fase gestacional mais crítica para a exposição

A avaliação da fase gestacional mais crítica foi realizada tendo como parâmetro as diferenças relacionadas ao peso ao nascer nos diferentes grupos expostos. Para isso, avaliamos os efeitos da exposição em 3 períodos gestacionais com base nas diferentes fases de troca materno-fetal, a saber: Fase A: histotrófica (do 1º. ao 5º dia), Fase B: placenta vitelínica (do 6º. ao 10º. dia) e Fase C: placenta córion-alantoidiana (do 11º. dia até o final da gestação). Assim formamos 8 grupos a partir de fêmeas G2 nascidas e crescidas na câmara recebendo ar não filtrado. de modo que cada um deles passasse períodos distintos da gestação alternadamente na câmara poluída ou na câmara limpa (Quadro 2). Os grupos F1 e F2 foram considerados os grupos controles.

Quadro 2- Períodos de exposição dos 10 grupos de animais em câmara recebendo ar não filtrado (nf) ou ar filtrado (f) de acordo com as fases da gestação.

Grupos	Exposição pré gestacional	Fase A (1º ao 5º dia)	Fase B (6º ao 10º dia)	Fase C (11º ao 18º dia)
nF1	nf	f	f	f
nF2	nf	nf	nf	nf
nF 3	nf	f	nf	nf
nF 4	nf	f	f	P
nF 5	nf	f	nf	f
nF 6	nf	nf	nf	f
nF 7	nf	nf	f	nf
nF 8	nf	nf	f	f
F1	f	f	f	f
F2	f	nf	nf	nf

6.10 Análise estatística

Toda a análise estatística foi realizada utilizando-se os softwares estatísticos SPSS 13 ou Unistat v5.5. Médias, erros padrões (SE) ou desvios padrões (SD) foram calculados para cada grupo.

Teste *t* pareado de Student foi utilizado para se realizar as comparações dos valores da concentração de PM_{2,5} entre as câmaras.

Para a comparação dos parâmetros reprodutivos, que envolviam apenas dois grupos de exposição (contagem de folículos ovarianos, morfologia do cordão umbilical, tempo para casalar, ciclo estral, etc...) nós utilizamos Teste *t* de Student ou teste de Mann-Whitney. Os índices reprodutivos nas duas câmaras foram comparados usando-se o teste Chi-quadrado.

Comparações múltiplas One-way ANOVA seguidas pelo teste de Tukey ou Kuskal-Wallis, seguidas pelo pós teste de Bonferroni foram aplicadas para comparação dos desfechos gestacionais morfologia placentária nos quatro grupos estudados. Para monitorar a variação entre indivíduos de um mesmo grupo, nós também calculamos o coeficiente de variação observado (CV- desvio padrão/média) para algumas variáveis.

Uma análise multivariada (two-way ANOVA) foi realizada para se avaliar os efeitos da exposição pré concepcional e gestacional sobre os desfechos gestacionais e morfologia da placenta. Este teste produz um termo de interação que identifica se o efeito de um fator (exposição pré-concepcional) é ou não influenciado pelo efeito

de outro fator (exposição durante a gestação) Hipótese nula foi rejeitada ao nível de probabilidade de $P < 0,05$.

Para a avaliação do período gestacional no qual a exposição seria mais crítica para a ocorrência de baixo peso, conduzimos uma regressão logística preditiva. O baixo peso neste caso foi definido como os valores abaixo do 1º quartil ($< 0,649\text{g}$). A variável resposta (baixo peso) ficou definida como 0 se peso fetal $> 0,649$ e 1 se peso fetal $< 0,649$. Como variáveis independentes foram considerados os 4 períodos distintos de exposição materna ao ar não-filtrado: M, GS1, GS2 e GS3 descritos anteriormente. Foram obtidos os ORs (odds ratio) ajustados com seus respectivos intervalos de confiança (IC), considerando significativo o valor de $P = 0,05$.

7. RESULTADOS

A investigação dos parâmetros reprodutivos foi realizada considerando-se diferentes grupos e tipos de exposição.

Para os parâmetros reprodutivos associados às fêmeas, avaliamos dois grupos com 20 fêmeas cada. Um grupo de fêmeas G2 nascidas e crescidas na câmara recebendo ar filtrado (F) e outro de fêmeas nascidas e crescidas em câmara recebendo ar ambiente (nF).

Para os parâmetros de capacidade reprodutiva do casal (índices de acasalamento, fertilidade e tempo de acasalamento), também consideramos apenas dois grupos de casais (10 casais por grupo) da segunda geração: um grupo de casais nascidos e crescidos em câmara recebendo ar filtrado (F) e outro de casais nascidos e crescidos na câmara recebendo ar ambiente (nF).

Já para avaliação de parâmetros relacionados ao desenvolvimento da gestação (perdas fetais, falhas implantacionais, reabsorção fetal, peso da placenta e peso fetal), trabalhamos com 4 grupos de 10 fêmeas cada, F1, F2, nF1 e nF2.

Para a avaliação dos efeitos sobre a morfologia funcional do cordão umbilical, trabalhamos com dois grupos de fetos, sendo cinco por grupo, os quais são resultado da gestação de fêmeas distintas dos grupos F1 e nF2.

No caso da avaliação do período crítico da gestação utilizamos 10 grupos experimentais (ver Quadros 1 no item 4. Metodologia) com cerca de 10 animais em cada um.

7.1 Níveis de Poluição

Durante o período de exposição, 4 amostras semanais foram obtidas para medir a concentração do $PM_{2,5}$ nas câmaras de exposição. A concentração média na câmara recebendo ar ambiente (não filtrada) foi de $27,5 \mu g.m^{-3}$ (CV = 44%) e os valores de foram similares a concentração medida no ambiente externo. Entretanto o valor médio ($6,5 \mu g.m^{-3}$; CV = 49%) foi significativamente menor na câmara recebendo ar filtrado ($P < 0,001$), o que representa uma redução de 71% na concentração de $PM_{2,5}$. Os valores ambientais médios de NO_2 , CO e SO_2 foram $101 \mu g.m^{-3}$ (CV = 43%), $1,81 \mu g.m^{-3}$ (CV = 50%) e 7,66 ppm (CV = 64%) respectivamente.

A análise elementar realizada em 102 $PM_{2,5}$ filtros coletados no local da exposição entre os meses de Agosto/2005 e Maio/2007 permitiram identificar a composição relativa deste material particulado (Tabela 1).

7.2 Desfechos reprodutivos relacionado à fêmea

Os valores dos parâmetros relacionados ao ciclo estral e contagem dos folículos ovarianos estão apresentados na Tabela 2. A exposição à poluição do ar ambiental afetou a duração do ciclo ($P = 0,001$), caracterizado por um período de estro estendido e portanto reduzindo o número de ciclos durante o período estudado ($P = 0,03$) nas fêmeas do grupo (nF), ou seja expostas ao ar não filtrado.

Tabela 1. Análise descritiva da composição elementar presente nas amostras de PM_{2,5} através da Fluorescência dispersiva de raio X. O carbono (C) foi utilizado como parâmetro para o cálculo da composição elementar relativa dos demais elementos.

<i>Elementos do PM_{2,5}</i>	Média (SD) em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$	n
Massa	0,47 (0,03) mg	97
Al	5054 (668)	101
Ca	3271 (541)	102
Cu	238,6 (34,0)	102
Fe	3182 (620)	102
K	2720 (395)	102
Na	5540 (246)	91
Ni	40,68 (5,97)	102
P	1415 (184)	102
Pb	97,96 (23,8)	102
S	9837 (1021)	102
Si	3545 (406)	102
Ti	188,1 (42,6)	102
V	64,78 (9,06)	102
Zn	757,8 (110)	102
C	98,0 (0,30)%	102

O número de folículos antrais mostrou-se significativamente reduzido ($P=0,04$) nas fêmeas do grupo exposto à poluição (nF) quando comparado com o número nas fêmeas do grupo exposto ao ar filtrado (F). Nós não observamos diferenças no número de folículos pequenos, em crescimento e pré-ovulatórios entre os dois grupos. Os coeficientes de variação para todos os parâmetros mostraram-se maiores no grupo de fêmeas expostas quando comparado ao grupo não exposto ($P < 0,001$).

Tabela 2. Média (DP) dos parâmetros referentes ao ciclo estral e contagem de folículos ovarianos.

Parâmetro	n	Grupo				p
		F		nF		
		Média (SD)	CV	Média (SD)	CV	
Nº ciclos*	20	2,6 (0,22)	8%	1,2 (0,29)	34%	0,001
% dias em estro/período	20	34,57 (6,68)	19%	56,63 (11,65)	20%	0,03
Nº de dias em estro	20	4,1 (0,8)	19%	6,8 (1,4)	20%	0,001
Nº Folículos						
pequenos	5	346(52,5)	15%	240,7(123,7)	51%	ns
em crescimento	5	160,6 (30,9)	19%	128,2 (26,5)	20%	ns
antrais	5	118,6 (18,4)	15%	75(35,2)	46%	0,04
Pré-ovulatório	5	10,6 (2)	18%	6,6(3,9)	25%	ns
Nº total de folículos	5	635,8 (74,4)	11%	450,5 (178,1)	39%	ns

F =filtrada, nF=não-filtrada, *número de ciclos durante o período estudado

7.3 Desfechos reprodutivos relacionados ao casal

Na Tabela 3 estão representados os valores dos desfechos reprodutivos relacionados ao casal nos dois grupos avaliados (F e nF) Nós observamos um aumento significativo no tempo necessário para que o acasalamento ocorresse e um decréscimo nos índices de fertilidade e gestação nos casais da câmara que recebeu ar ambiente (P=0,003).

Tabela 3. Média (SD) dos valores referentes aos parâmetros de desfecho reprodutivo relacionados ao casal.

Parâmetro	n	Grupo				p
		F		nF		
		Média (SD)	CV	Média (SD)	CV	
Índice de acasalamento (%)	20	100		100		ns
Tempo (em dias) necessário para o acasalamento ocorrer	20	3,5 (1,54)	44%	10,65 (5,77)	54%	0,0001
Índice de Fertilidade (%)	20	95		55		0,003
Índice de Gestação (%)	20	95		55		0,003

7.4 Desfechos gestacionais

Os dados sobre os desfechos gestacionais nos quatro grupos estudados (F1, F2, nF1 e nF2) estão apresentados na Tabela 4. O índice médio de perdas pós implantacionais mostra-se aumentado no grupo nF2 quando comparado ao grupo F1 ($P \leq 0,005$) e é influenciado tanto pela exposição no período pré gestacional ($P < 0,004$) quanto no período gestacional ($P < 0,01$). A diferença representa um aumento médio de 70% no índice. O peso fetal é maior nos animais do grupo F1 ($0,86 \pm 0,18g$) do que no grupo nF2 ($0,68 \pm 0,10g$). O peso fetal foi influenciado tanto pela exposição pré-gestacional ($P < 0,001$) quanto pela exposição no período gestacional ($P < 0,001$) e mostra um efeito de interação entre estes dois fatores ($P < 0,001$). O peso fetal no grupo F1 mostra-se maior ($P < 0,001$) quando comparado aos demais grupos (F2, nF1 e nF2), sendo 21 % maior em relação ao grupo nF2. O tamanho da ninhada não variou entre os grupos.

Tabela 4. Média (SD) para os parâmetros referentes aos desfechos gestacionais.

Parâmetro	n	Grupo								p
		F1		F2		NF1		NF2		
		Média (SD)	CV	Média (SD)	CV	Média (SD)	CV	Média (SD)	CV	
Nº fetos vivos por ninhada	10	6,8(2,78)	41%	7(2,09)	29%	6,44(2,83)	43%	5,88(2,02)	34%	ns
Nº fetos mortos por ninhada	10	0	0	0,18(0,59)	>100%	0,1(0,44)	>100%	0,1(0,33)	>100%	ns
Índice de implantações (%)	10	92,5(4,1)	4%	87,2(4,8)	5%	84,1(4,2)	4%	85,4(4,4)	5%	ns
Índice de perda pré-implantacional (%)	10	7,5(4,7)	62%	12,7(4,7)	37%	15,8(4,2)	26%	14,5(4,3)	30%	ns
Índice de perda pós-implantacional (%) ^{a,b}	10	12,1(5,8)	47%	26,3(3,9)	14%	29,7(5,7)	19%	41,7(5,8)	13%	0,005
Peso fetal (g) ^{a,b,c}	10	0,86(0,18)	20%	0,69(0,07)	10%	0,72(0,1)	13%	0,68(0,11)	16%	0,0001

^a efeito significativo da exposição pré-gestacional; ^b efeito significativo da exposição gestacional; ^c

efeito de interação significativo.

7.5 Placenta

Os dados referentes aos aspectos morfofuncionais avaliados na placenta estão sumarizados nas Tabelas 5 e 6. Embora os coeficientes de variação (CV) para os dados da placenta não estejam mostrados, com poucas exceções, foram maiores no Grupo nF2 (exposição pré-gestacional e gestacional ao ar não filtrado), variando de 15-54%. De uma maneira geral, as maiores diferenças foram relacionadas ao espaço sanguíneo materno e condutância de difusão (35-54%). Em contraste, os CVs das variáveis da placenta tenderam a ser menores no grupo F1, ou seja, no grupo exposto somente ao ar filtrado (variando de 7-24%).

Tamanho da ninhada e Peso fetal

No grupo F1 o peso médio da ninhada foi 6,41 g, o número médio de filhotes 7,4 e o peso médio dos filhotes 0,905 g (Tabela 5). Aqui novamente observamos que o peso fetal foi influenciado tanto pela exposição pré-gestacional ($P<0,05$) quanto gestacional ($P<0,01$), mas o tamanho da ninhada não variou significativamente entre os grupos avaliados. Entretanto o peso total da ninhada apresentasse uma tendência a ser menor nos grupos expostos ao ar ambiente (nF1 e nF2), o efeito não foi significativo, embora o pós-teste (não mostrado) indicasse uma diferença significativa no peso total da ninhada entre os grupos F1 e nF2 ($P<0,05$).

Volume dos compartimentos placentários

Não houve um efeito principal ou efeito de interação envolvendo o volume total placentário ou os volumes da decídua, zona juncional e labirinto (Tabela 5). Mas observou-se um efeito de interação no volume da placa coriônica. A análise mais detalhada dos sub-compartimentos do labirinto, mostrou que o volume dos espaços sanguíneos maternos estava reduzido nos grupos expostos ao ar ambiente durante a gestação ($P<0,001$). As diferenças foram de 22% quando comparados os grupos F1 e F2, e 37% quando comparados os grupos nF1 e nF2. A aparente diferença entre o volume dos capilares fetais e do trofoblasto não foi significativa (Fig. 10).

Área das superfícies de troca e diâmetro dos capilares e espaços sanguíneos maternos

No grupo F1, a área de superfície de troca para os espaços sanguíneos maternos e capilares foi de 19,1 cm² e 17,1 cm² respectivamente (Tabela 6). A superfície dos espaços sanguíneos maternos apresentou uma redução de 11-13% ($P<0,05$) nos grupos que passaram o período gestacional exposto a poluição (F2 e nF2). E ao contrário, a área de superfície dos capilares fetais foi maior nestes grupos ($P<0,01$) e também nos grupos expostos ao ar não filtrado no período gestacional ($P<0,05$). Como consequência destas alterações, houve um efeito significativo na razão entre a área de superfície com valores diminuindo significativamente (de 20-40%) nos grupos expostos durante a gestação ao ar não filtrado ($P<0,001$). As diferenças nos volumes e superfícies vasculares foram acompanhadas por mudanças no diâmetro médio dos espaços sanguíneos maternos, mas não dos capilares (Tabela 6). No grupo F1, os espaços sanguíneos materno tiveram um diâmetro médio aparente de 33 μ m sendo o efeito tanto da exposição gestacional e pré-gestacional significativos ($P<0,01$ em ambos os casos). Em ambos os períodos o diâmetro dos espaços sanguíneos maternos diminuiu.

Espessura da barreira intervascular

Nas placentas do grupo F1, a média aritmética da espessura da barreira intervascular foi cerca de 14 μ m (Tabela 6); mas a aparente diminuição nos outros grupos não foi significativa e não houve um efeito de interação.

Condutância de difusão do oxigênio

A média da condutância total do oxigênio da membrana intervacular no grupo F1 foi de $0,0022 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$ (Tabela 6) e este valor aumentou significativamente quando a exposição ao ar não filtrado ocorreu no período pré-gestacional ($P < 0,05$). O aparente aumento da condutância quando a exposição ocorre no período gestacional não foi significativa e também não foi detectado um efeito de interação.

Quando normalizada para diferenças no peso fetal, a condutância massa-específica no grupo F1 foi de $0,0026 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (Tabela 6). Este valor aumenta quando a exposição ao ar não filtrado ocorre nos períodos pré-gestacional e/ou gestacional ($P < 0,01$ em ambos os casos).

Tabela 5. Efeito do período de exposição (pré-gestacional e gestacional) no tamanho da ninhada, no peso fetal (g) e volumes placentários (mm^3). Os valores representam as médias (SE) para $n=7$ camundongos.

Parâmetro	Grupo F1	Grupo F2	Grupo nF1	Grupo nF2
Peso da ninhada	6,41 (0,65)	4,92 (0,43)	4,66 (0,74)	4,37 (0,64)
nº filhotes por ninhada	7,4 (1,02)	7,1 (0,7)	6,4 (1,0)	6,4 (0,75)
^{a,b} Peso fetal	0,905 (0,076)	0,694 (0,019)	0,722 (0,026)	0,664 (0,047)
Volume da placenta	97,0 (4,9)	90,4 (6,0)	83,8 (4,7)	96,2 (6,5)
Volume da decídua	17,5 (3,3)	18,9 (4,1)	15,2 (1,8)	21,5 (4,5)
Volume da zona juncional	20,4 (0,9)	20,9 (1,5)	16,2 (1,2)	20,2 (1,6)
^c Volume da placa coriônica	9,5 (0,9)	8,2 (1,1)	6,3 (0,8)	11,2 (1,4)
Volume do labirinto	49,6 (2,1)	42,4 (1,8)	46,1 (2,7)	43,3 (3,6)
Volume do trofoblasto	25,9 (1,6)	22,5 (1,8)	23,6 (1,8)	24,4 (1,6)
^b Volume dos espaços sanguíneos materno	15,6 (0,7)	12,2 (0,04)	14,7 (0,8)	9,2 (1,9)
Volume do capilar fetal	8,0 (0,8)	7,7 (0,6)	7,7 (0,8)	9,6 (1,1)

^a efeito significativo da exposição pré-gestacional; ^b efeito significativo da exposição gestacional; ^c efeito de interação significativo.

Fig. 10- Fotomicrografia de cortes histológicos da placenta. Em (A) grupo F1 e em (B) grupo nF2. Seta, capilares fetais; cabeça de seta, espaço sanguíneo materno. (Azul de toluidina, 40X)

Tabela 6. Efeitos do período de exposição (pré-gestacional e gestacional) nas superfícies de troca (cm^2), calibres dos vasos e espaços sanguíneos (μm), média aritmética da espessura da barreira (μm) e condutâncias total e massa-específica ($\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$ and $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). Os valores representam as médias (SE) do grupo para $n=7$ camundongos.

Parâmetro	Grupo F1	Grupo F2	Grupo nF1	Grupo nF2
^b Superfície do espaço sanguíneo materno	19,1 (0,84)	16,6 (0,78)	19,9 (1,14)	17,8 (1,04)
^{a,b} Área de superfície do capilar fetal	17,1 (0,46)	18,8 (1,06)	17,8 (2,00)	25,5 (1,93)
^b Razão entre as superfícies	1,12 (0,04)	0,89 (0,04)	1,19 (0,13)	0,71 (0,05)
^{a,b} Diâmetro do espaço sanguíneo materno	32,9 (1,55)	29,9 (1,78)	29,6 (0,95)	20,1 (3,36)
Diâmetro do capilar fetal	18,7 (1,84)	16,6 (1,27)	17,5 (0,84)	15,3 (1,70)
Espessura do trofoblasto	14,3 (0,65)	12,7 (0,68)	12,7 (1,02)	11,6 (1,14)
^a Condutância total	0,0022 (0,0001)	0,0025 (0,0001)	0,0027 (0,0003)	0,0035 (0,0005)
^{a,b} Condutância específica	0,0026 (0,0003)	0,0035 (0,0002)	0,0037 (0,0004)	0,0054 (0,0007)

^a efeito significativo da exposição pré-gestacional; ^b efeito significativo da exposição gestacional; ^c efeito de interação significativo.

7.6 Cordão Umbilical

Os dados referentes ao estudo estereológico dos cordões umbilicais estão apresentados na Tabela 7. No grupo F1, o volume total do cordão apresentou uma redução de aproximadamente 24% ($P=0,001$) devido a uma redução no volume de mesênquima ($P<0,001$). Com relação ao comprimento dos cordões, não foram observadas diferenças significativas (dados não apresentados). O volume da veia alantoidiana do cordão dos fetos do grupo nF2, ou seja, exposto ao ar não filtrado durante o período de desenvolvimento intra-uterino, mostrou-se aumentado ($P=0,04$). A avaliação do volume da luz dos vasos umbilicais indicou uma diminuição significativa de 28% e 38%, na veia alantoidiana e na veia vitelínica respectivamente. O volume da parede da veia alantoidiana também estava aumentado no grupo nF2 ($P<0,001$). A análise morfométrica das áreas seccionais do cordão e dos vasos está apresentada na Tabela 8. Os cordões umbilicais dos animais expostos ao ar não filtrado são menos calibrosos ($P=0,03$) quando comparados ao grupo exposto ao ar filtrado. Quanto aos vasos observa-se uma redução significativa da área seccional da artéria vitelínica ($P=0,009$) no grupo nF2. A área luminal das veias alantoidiana e vitelínica estavam reduzidas no grupo nF2, e esta redução estava acompanhada de um aumento na espessura da parede desses vasos. Nesses vasos observou-se ainda uma diminuição significativa na razão entre a área da luz e da parede (P.

Tabela 7. Efeito da exposição no volume (mm³) dos compartimentos e estruturas vasculares do cordão umbilical.

Parâmetro	n	Grupos				p
		F1		nF2		
		Média	SD	Média	SD	
Volume total	6	1,473	0,173	1,113	0,138	0,002
Volume dos vasos	6	0,453	0,084	0,474	0,088	ns
Volume do mesênquima	6	1,027	0,153	0,664	0,045	<0,001
Volume total	6					
A. alantoidiana	6	0,125	0,024	0,152	0,042	ns
V. alantoidiana	6	0,115	0,011	0,143	0,028	0,04
A. vitelínica	6	0,062	0,035	0,048	0,029	ns
V. vitelínica	6	0,151	0,049	0,133	0,026	ns
Volume da luz						
A. alantoidiana	6	0,035	0,013	0,043	0,014	ns
V. alantoidiana	6	0,067	0,013	0,048	0,014	0,030
A. vitelínica	6	0,033	0,025	0,024	0,018	ns
V. vitelínica	6	0,094	0,015	0,058	0,022	0,008
Volume da parede						
A. alantoidiana	6	0,090	0,013	0,108	0,028	ns
V. alantoidiana	6	0,048	0,007	0,094	0,022	<0,001
A. vitelínica	6	0,028	0,012	0,023	0,014	ns
V. vitelínica	6	0,057	0,037	0,075	0,014	ns

A., artéria; V., veia

Tabela 8. Efeito da exposição ao ar não-filtrado na área seccional do cordão e vasos umbilicais (µm²), razão luz/parede e espessura da parede dos vasos umbilicais (µm).

Parâmetro	n	Grupos				p
		F1		nF2		
		Média	SD	Média	SD	
Volume total (mm)	6	1,473	0,173	1,113	0,138	0,003
Volume dos vasos	6	0,453	0,084	0,474	0,088	ns
Volume do mesênquima	6	1,027	0,153	0,664	0,045	<0,001
Volume total	6					
A. alantoidiana	6	0,125	0,024	0,152	0,042	ns
V. alantoidiana	6	0,115	0,011	0,143	0,028	0,04
A. vitelínica	6	0,062	0,035	0,048	0,029	ns
V. vitelínica	6	0,151	0,049	0,133	0,026	ns
Volume da luz						
A. alantoidiana	6	0,035	0,013	0,043	0,014	ns
V. alantoidiana	6	0,067	0,013	0,048	0,014	0,020
A. vitelínica	6	0,033	0,025	0,024	0,018	ns
V. vitelínica	6	0,094	0,015	0,058	0,022	0,040
Volume da parede						
A. alantoidiana	6	0,090	0,013	0,108	0,028	ns
V. alantoidiana	6	0,048	0,007	0,094	0,022	<0,001
A. vitelínica	6	0,028	0,012	0,023	0,014	ns
V. vitelínica	6	0,057	0,037	0,075	0,014	<0,01

A., artéria; V., veia

Os resultados do estudo quantitativo da fração de área da parede dos diferentes vasos umbilicais, artérias e veias alantoidianas e vitelínicas, marcados positivamente para Isoprostano (Fig.11) e Receptor de endotelina (Fig.12) são mostrados na Tabela 9.

Os resultados indicam que tanto a fração de área do receptor de endotelina-1 quanto do Isoprostano estavam aumentadas na parede das artérias e veias umbilicais dos fetos expostos ao ar não filtrado (nF2). A imunoreatividade média no grupo nF2 foi cerca de 87% e 56% maior nas artérias e veias respectivamente se comparada ao grupo exposto ao ar filtrado.

Tabela 9. Fração de área ocupada (%) por marcação imuno-positiva para Isoprostano e Receptor de Endotelina-1 na parede dos vasos umbilicais.

Antígeno	Vasos umbilicais	n	Grupo				p
			F1		nF2		
			Média	SD	Média	SD	
Isoprostano	A. alantoidiana	6	0,58	0,52	5,16	4,06	<0,003
	V. alantoidiana	6	1,94	2,13	4,73	2,11	<0,03
	A. vitelínica	6	0,60	0,92	4,43	2,57	<0,004
	V. vitelínica	6	4,48	2,70	9,77	5,18	<0,04
Receptor de endotelina-1	A. alantoidiana	6	2,87	1,92	7,64	3,92	0,01
	V. alantoidiana	6	2,13	1,44	8,54	2,91	<0,001
	A. vitelínica	6	2,86	1,37	9,41	4,27	<0,005
	V. vitelínica	6	3,34	1,76	9,17	3,99	<0,004

A., artéria; V., veia

Fig.11- Fotomicrografia de corte de vasos do cordão umbilical marcados para identificação de isoprostano. Em (A) e (a), artéria alantoidiana; (B) e (b) veia alantoidiana do grupo F1. Em (C) e (c), artéria alntoidiana; (D) e (d), veia alantoidiana do grupo nF2 (aumento 20X e 40X).

Fig.12- Fotomicrografia de corte de vasos do cordão umbilical marcados para identificação de ETAR. Em (A) e (a), veia alantoidiana; (B) e (b) artéria alantoidiana do grupo F1. Em (C) e (c), veia alntoidiana; (D) e (d), artéria alantoidiana do grupo nF2.

Ainda considerando o peso fetal realizamos uma análise para avaliar qual seria o período de exposição (pré-gestacional, GS1, GS2 e GS3) mais determinante na redução do peso. Para esta análise consideramos os 10 grupos experimentais (L1, L2, P1, P2, P3, P4, P5, P6, P7 e P8).

Observamos que a exposição da mãe no período de vida pré-gestacional é um fator de risco para baixo peso ao nascer (OR=6,12; IC 95%: 1,8-20,3, P=0,003), assim como a exposição materna na primeira fase da gestação (OR =2,16; IC 95%: 1,15-4,05; P=0,016).

8. DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos os efeitos da exposição aos níveis ambientais do material particulado de origem veicular sobre parâmetros reprodutivos e gestacionais enfatizando a morfologia funcional da placenta e do cordão umbilical em um modelo de duas gerações de camundongos.

Desfechos Reprodutivos

Os resultados mostram pela primeira vez que fêmeas de camundongos expostas à poluição apresentam alterações no ciclo estral, uma redução significativa no número de folículos antrais, além de um comprometimento da gestação revelado por alterações morfo-funcionais da placenta e do cordão umbilical. Também mostramos que parâmetros relacionados à capacidade reprodutiva do casal são negativamente afetados pela exposição, observando-se uma redução nos índices de fertilidade e gestação e a necessidade de um tempo maior para que a cópula ocorra. Mostramos que a exposição materna antes da concepção pode ser isoladamente um fator de comprometimento do desenvolvimento normal do feto.

Estudos experimentais prévios de nosso grupo mostraram que a exposição aos níveis ambientais de poluição do ar na cidade de São Paulo, pode afetar a fertilidade de fêmeas de camundongos, diminuir o número de fetos viáveis e aumentar o número de falhas implantacionais (Mohallem et al., 2005) e provocar alterações na razão sexual macho/fêmea (Lichtenfels et al., 2007) na primeira

geração de camundongos expostos. Estes achados estão em concordância com estudos epidemiológicos que também mostram efeitos adversos da exposição na saúde reprodutiva (Wang et al., 1997; Bobak and Leon, 1992; Selevan et al., 2000; Woodruff et al., 2003; Huynh et al, 2006; Ritz et al, 2007; Slama et al., 2007).

O presente estudo confirmou os achados anteriores de diminuição da fertilidade e ainda mostrou que a exposição por duas gerações determina alterações em outros parâmetros da capacidade reprodutiva, tais como a redução significativa do peso fetal.

Até onde nós sabemos, este é o primeiro estudo que investigou a associação entre a exposição à poluição do ar e o ciclo estral, contagem de folículos e o tempo necessário para acasalar. O monitoramento do ciclo estral nos deu informações sobre a duração e alterações na ciclicidade, tais como a indução do estro persistente. Isto pode refletir um comprometimento da ovulação bem como alterações nos níveis circulantes de hormônios ovarianos. O período de estro estendido geralmente indica que a fêmea não consegue atingir espontaneamente o nível ovulatório de hormônio luteinizante (Huang e Meites, 1975). Tipicamente o estro persistente ocorre em resposta a agentes tóxicos que possuem propriedades estrogênicas ou a habilidade de bloquear a ovulação (EPA, 1996).

Embora não tenhamos observado uma redução significativa no número de folículos pré-ovulatórios, o número de folículos antrais mostrou-se reduzido. Os folículos antrais representam o último estágio de desenvolvimento folicular antes da ovulação e são o único tipo de folículo capaz de liberar oócitos para a fertilização e sintetizar estrógeno (Hirshfield, 1997), que é essencial para a normalidade do ciclo

menstrual/estral. Qualquer aumento na taxa de perdas foliculares pode potencialmente aumentar a possibilidade de senescência sexual (falência ovariana prematura) e menopausa precoce em mulheres (Rowe, 2006). Isso pode ser particularmente importante se considerarmos o número cada vez maior de mulheres que vivem nos grandes centros urbanos que iniciam a maternidade por volta dos 35-40 anos (Gindoff e Jewelewicz, 1986).

A diminuição da fertilidade observada em nossos animais pode ser explicada por diferentes fatores: alterações no eixo neuroendócrino-gonadal, desequilíbrios hormonais, comprometimento do ciclo estral, alterações no “ambiente” materno, comprometimento da qualidade do esperma ou ainda alterações no comportamento sexual (Selevan et al., 2000; Holson et al., 2005). Em nosso estudo tanto as fêmeas quanto os machos foram expostos igualmente; assim, a diminuição da fertilidade deve ser considerada um indicador geral da toxicidade reprodutiva.

A exposição durante a gestação afetou o desenvolvimento fetal, reduzindo significativamente o peso fetal, apresentando uma redução média de 21% no grupo em que a mãe foi exposta antes e durante gestação (nF2) quando comparado ao grupo não em nenhum dos períodos (F1). Curiosamente, a exposição somente durante o período pré-gestacional também resultou em reduções no peso fetal. Nós ainda observamos um efeito de interação que exacerbou a redução do peso dos fetos de mães expostas em ambos os períodos. A avaliação do período crítico de exposição para aumento no risco de baixo peso fetal também mostrou que a exposição pré-gestacional está associada a um risco aumentado, bem como a exposição logo no início da gestação, que corresponde ao período implantacional.

De maneira semelhante ao observado para o peso fetal, a exposição durante a gestação e/ou durante o período pré-gestacional determinaram aumento nos índices de perdas pós implantacionais. O efeito significativo decorrente da exposição prévia à gestação sugere que alterações sistêmicas ou um ambiente uterino comprometido antes da gestação podem estar envolvidos. Nos mamíferos, a maior parte das perdas embrionárias ocorre no início da gestação, considerado um período crítico, pois os principais eventos do desenvolvimento ocorrem neste período, tais como a formação da placenta e a organogênese (Reynolds e Redmer, 2001).

A preparação do endométrio uterino para a implantação é outro ponto chave para o sucesso da interação materno-fetal e está sob o controle de estímulos hormonais (estrógeno, progesterona) seqüenciais.

Os elementos presentes em nossos filtros (Pb, Cd) são conhecidos por afetar o ambiente hormonal interno, inibindo a síntese de hormônios de crescimento, a mitose ou a diferenciação celular, prejudicando por fim implantação, podendo causar perdas embrionárias (Watanabe, et al., 1979, Wide, 1985; Yang et al., 2004).

Estudos toxicológicos mostram que substâncias como os HPA e os metais pesados, também encontrados na poluição do ar, são ovotóxicos e disruptores endócrinos potenciais, que interferem com a função ovariana, produzindo a depleção dos folículos, interrupção do crescimento folicular e falência ovariana precoce (Mattison, 1982; Mattison et al., 1983; Mattison e Thomford, 1989, Hoyer e Sipes, 1996; Borman et al., 2000; Miller et al., 2004).

Análises prévias de amostras de emissões geradas pela queima de combustíveis fósseis confirmam a presença de muitos carbonos aromáticos, alcoóis de grande peso molecular, HPA e derivados componentes fenólicos, que tem sido relatados como estrógenos ambientais que podem interferir no ciclo ovulatório e na fertilidade (Jingxian et al., 2003; Miller et al., 2004).

Nos grandes centros urbanos, a emissão gerada por motores a gasolina e diesel representa a maior fonte de poluição particulada, o que determina os aspectos qualitativos do PM e suas características químicas e toxicológicas (Kok et al., 2006). A análise elementar conduzida nos filtros coletados no local da exposição de nossos animais revelou a presença de vários metais pesados, tais como o V, Cu, Pb e o Zn, provavelmente envolvidos nos efeitos tóxicos da poluição observados. Embora nós não tenhamos identificado o mecanismo exato envolvido na diminuição da capacidade reprodutiva e prejuízo do desenvolvimento fetal, nossos dados sugerem que os componentes presentes na poluição particulada do ar interferem no processo reprodutivo modulando ou prejudicando as vias sinalização, ou por dano direto ao órgão comprometendo sua função.

Placenta

Uma das hipóteses deste estudo foi a de que a exposição à poluição particulada poderia resultar em alterações na morfologia funcional da placenta nos camundongos expostos. E de fato, as reduções no peso fetal foram acompanhadas por uma diminuição do volume, do calibre médio dos espaços sanguíneos maternos

e da razão entre a superfície de troca materna e fetal, aumento na área total de superfície dos capilares fetais, além de um incremento na condutância total de difusão e condutância massa-específica da barreira intervacular. Tanto o período de exposição pré-gestacional quanto o período gestacional resultaram em alterações morfológicas na placenta, mas a exposição durante a gestação foi associada às mudanças mais marcantes.

Entretanto, o período pré-gestacional, também provocou redução no diâmetro dos espaços sanguíneos maternos, o que sugere que essas alterações vasculares maternas resultam de alterações sistêmicas ou de um comprometimento uterino prévio à gestação, assim como indicado pelo índice de perdas pós implantacionais, reforçando o fato de esta exposição prévia ser crítica para o desenvolvimento fetal/embrionário. Apesar das alterações vasculares maternas, o aumento da superfície dos capilares fetais ajudou a aumentar a condutância total e massa-específica da barreira intervacular. Os coeficientes de variação (CV) indicam que a maior parte dos parâmetros avaliados variou menos (7-24%) nos grupos expostos ao ar filtrado durante os dois períodos estudados (pré-gestacional e gestacional). Ao contrário, nos grupos expostos ao ar não filtrado durante os dois períodos (nF2) os CVs variaram mais (15-54%). A maior variação entre indivíduos do mesmo grupo pode ser um indicador de uma menor adaptabilidade ao ambiente poluído. Mas contrastando com isso, os coeficientes para o peso fetal variaram mais nos grupo F1 (22%) e isto provavelmente indica que a condição do ar filtrado impõe um menor estresse ambiental.

A presente estimativa dos parâmetros morfofuncionais da placenta pode ser comprovada com as obtidas em estudos anteriores sobre a placenta de camundongos (Coan et al. 2004; Watson e Cross, 2005; Rutland et al., 2007). A semelhança é maior para os volumes dos compartimentos, superfícies vasculares e razão entre as superfícies materno-fetal, e as discrepâncias podem ser atribuídas à diferença na linhagem dos animais utilizados. Mas diferenças mais marcantes existem entre o presente estudo e estudos prévios no que diz respeito à estimativa da média aritmética da espessura da barreira e na condutância de difusão. Parece que estas diferenças são influenciadas pelo método utilizado para se estimá-las; mas é importante ressaltar que no presente contexto, elas ainda permitem comparações válidas entre os diferentes grupos experimentais.

Uma possível exceção seria a da condutância, para a qual os resultados foram obtidos tentando-se substituir a média aritmética pela média harmônica na equação de difusão.

Nossas estimativas da média aritmética da espessura da barreira intervacular no grupo F1 (14,3 μm) foi obtida relacionando-se o volume do trofoblasto com combinação entre as superfícies dos capilares fetais e espaço sanguíneo materno. O valor obtido é maior que a estimativa obtida (4.8 μm), utilizando-se o comprimento em pontos randomicamente selecionados na superfície da barreira (Coan et al., 2004). Esta diferença provavelmente pode ser explicada pela curvatura local da superfície e pela diferenças na quantidade de tecido intervacular caracterizada por diferenças no método de obtenção.

Isto pode ser suportado pelo fato de que no trabalho de Coan et al. (2004) os dados de superfície e volume resultam em uma média aritmética de 14.5 μm , que é um valor essencialmente idêntico ao nosso. Estas diferenças na média aritmética da espessura da barreira intervacular contribuem em parte para a aparente inconsistência com as estimativas prévias da condutância total e massa específica (Coan et al., 2004).

Mas um fator adicional a ser considerado é o de que estas medidas de condutância são mais eficientes quando baseadas na média harmônica, uma vez que esta considera o peso apropriado para áreas mais finas da barreira através da qual a difusão passiva ocorre mais eficientemente. Foi demonstrado que a média harmônica da barreira é aproximadamente 9% menor que a média aritmética em camundongos no 18,5^o dia da gestação (Coan et al., 2004).

As diferenças no diâmetro dos vasos também podem ser explicadas por variações nos métodos empregados para seu cálculo. Estimativas prévias, obtidas, dividindo-se o volume dos vasos por seu comprimento resultam em valores de 11-16 μm para o espaço sanguíneo materno e de 8-15 μm para os capilares fetais (Coan et al., 2004; Rutland et al., 2005, 2007). Este método produz valores menores e menos tendenciosos, que valores obtidos dividindo-se o volume pela área de superfície, como ilustrado pelo fato de no trabalho de Coan et al. (2004) estes dados terem produzido uma estimativa de 20,6 μm no diâmetro do capilar fetal, valor este que é muito próximo a nossa estimativa de 18,7 μm para placentas do grupo F1.

Estudos epidemiológicos conduzidos em São Paulo e em outras cidades demonstram associação entre a exposição materna ao material particulado do ar poluído e efeitos adversos no desenvolvimento fetal incluindo o baixo peso (Wang et al., 1997, Pereira et al., 1998, Gouveia et al., 2004, Huynh et al., 2006). Aqui nós também observamos que a exposição á poluição do ar antes e durante a gestação não teve efeitos sobre o tamanho da ninhada, mas o peso médio fetal foi significativamente menor em mães criadas antes e/ou durante a gestação na câmara recebendo ar não filtrado.

O desenvolvimento placentário envolve uma extensiva angiogênese da vasculatura uteroplacentária e feto-placentária, bem como um aumento no fluxo sanguíneo uterino e umbilical (Kaufmann et al., 2004; Reynolds e Redmer, 1995). Assim, fatores que afetam o desenvolvimento e a função vascular terão impactos no crescimento, desenvolvimento e sobrevivência fetal (Kingdom et al., 2000; Sherer e Abulafia, 2001).

O espectro de alterações observadas em gestações associadas ao não filtrado é interessante no sentido de que algumas parecem ser adaptativas e outras deletérias. Assim a maior área de superfície dos capilares fetais, o aumento na condutância massa específica e total da barreira intervacular parecem ser adaptações feto placentárias que servem para manter e expandir o suporte de oxigênio e nutrientes para o feto em crescimento. Estas variáveis aumentam significativamente como resultado da exposição materna antes e durante a gestação. O fato de o peso fetal diminuir apesar destas adaptações implica que outros fatores estão agindo. Entre estes, deve-se considerar o efeito da diminuição

do volume e calibre dos espaços sanguíneos materno no lado materno da placenta. Em camundongos, os espaços sanguíneos maternos se desenvolvem e atingem o volume máximo entre o 14,5º e o 16,5º dia da gestação e conseqüentemente, isto representa o período máximo de perfusão no lado materno. Já os capilares fetais crescem mais entre 12,5º e 14,5º dia, mas após este período, seu volume e superfície se expandem até o 18,5º dia da gestação (Coan et al 2004; Watson e Cross, 2005; Rutland et al., 2005).

As alterações placentárias descritas sugerem um comprometimento do suprimento sanguíneo materno para a placenta e um aumento na resistência ao seu fluxo. Além disso, mostrou-se que o material particulado fino (PM_{2,5}), produz vasoconstrição em ratos saudáveis, embora seja das pequenas artérias do coração e pulmões (Rivero et al., 2005). Equivalentemente, o aumento esperado da resistência vascular devido à redução do calibre dos espaços sanguíneos maternos na placenta pode ter sido caracterizado pelo aumento na complexidade de ramificação destes espaços, o que é comparável a angiogênese ramificada ("branching angiogenesis") aumentada vista de capilares feto-placentários em humanos (Charnock-Jones et al., 2004). Mais estudos são necessários para se investigar se isto ocorre ou não no presente modelo de exposição.

Entre os diferentes poluentes presentes no ar, o CO (monóxido de carbono) é o único para o qual já se sabe o mecanismo de ação e influência no desenvolvimento fetal, causando hipóxia fetal pela formação de carboxi-hemoglobina em detrimento da oxi-hemoglobina. Os mecanismos pelos quais os outros poluentes, incluindo as partículas, influenciam o desenvolvimento fetal não

estão claros, mas os prováveis mecanismos incluem a indução de apoptose devido ao dano do DNA, indução da enzima p450, ligação a fatores de crescimento e o desequilíbrio endócrino. Outros fatores que podem influenciar o desfecho gestacional são: alterações sistêmicas no hematócrito, a viscosidade e coagulabilidade sanguínea, disfunção endotelial, estresse oxidativo e inflamação (Rivero et al., 2005; Baskurt et al., 1990; Knottnerus et al., 1990; Peters et al., 1997; Pekkanen et al., 2000; Sørensen et al., 2003; Delfino et al., 2005; Risom et al., 2005).

Cordão umbilical

Expandindo nossos estudos sobre os efeitos da poluição do ar sobre o desenvolvimento fetal e considerando nossos achados prévios que mostram alterações placentárias associadas a uma redução no peso fetal, investigamos se alterações morfológicas no cordão estariam associadas, uma vez que o comprometimento do fluxo sanguíneo do cordão umbilical pode ter efeitos deletérios na saúde do feto e do recém nascido.

De fato observamos que os cordões umbilicais dos fetos expostos durante o período gestacional são mais finos devido a uma redução do volume do tecido mesenquimal, há um aumento do volume total da artéria alantoidiana e ocorre uma diminuição no volume e área seccional das veias alantoidiana e vitelínica, acompanhadas por espessamento de suas paredes. Embora ocorra um espessamento da parede das artérias vitelínica e alantoidiana nos fetos expostos as

diferenças não foram significativas. Observamos também que a parede dos vasos umbilicais nos fetos expostos à poluição particulada apresenta peroxidação lipídica mais intensa e uma imunoreatividade positiva maior para os receptores de endotelina.

O suprimento normal de nutrientes e oxigênio bem como a remoção de CO e excrementos do metabolismo fetal dependem da circulação uteroplacentária e umbilical. Embora a os vasos umbilicais sejam importantíssimos para a manutenção da circulação materno-fetal, a estrutura normal e patológica dos vasos umbilicais em humanos e animais experimentais não tem sido muito estudada. A maior parte dos estudos que avaliaram alterações nos cordões umbilicais associadas a desfechos gestacionais negativos são ultrassonográficos.

Estes estudos mostram que variações morfológicas e morfométricas do cordão umbilical e um remodelamento dos vasos e do tecido mesenquimal estão associadas a desfechos gestacionais negativos ou a patologias gestacionais. Em gestações complicadas por pré-eclampsia, as áreas seccionais da geléia de Wharton e da veia umbilical estão reduzidas quando comparadas a gestações normais (Raio et al., 2002). Além disso, observa-se uma substituição do ácido hialurônico por glicosaminoglicanas sulfatadas, tanto da artéria quanto da geléia de Wharton. Cordões umbilicais finos são comuns em fetos com restrição do crescimento intrauterino, e nestes casos também há uma redução na área seccional de todas as estruturas vasculares, o que implica em um fluxo sanguíneo diminuído (Raio et al., 2003). Rojas et al. (2006) observaram que os vasos umbilicais de fetos com restrição do crescimento apesar de mais finos quando comparados a fetos normais,

apresentam um índice aumentado de proliferação das células musculares da parede. A proliferação de células musculares lisas vasculares é comum a uma série de doenças vasculares e a hipóxia é um fator importante nestes casos (Bausero et al., 2000; Hassoun et al., 1992; Mandegar et al., 2004). Além disso, aumentos no diâmetro do cordão são observados em gestações complicadas por diabetes (Weissman e Jakobi, 1997).

O tecido mesenquimal, conhecido como geléia de Wharton em cordões humanos, preenche e envolve os vasos umbilicais, desempenhando diferentes funções, tais como reservatório de fatores de crescimento (IGF-I, FGF e TGF beta); como proteção física aos vasos umbilicais e um papel metabólico importante na manutenção da função normal dos vasos. Além disso, as células do mesênquima apresentam atividade contrátil, participando dos mecanismos de regulação do fluxo (Bruch et al., 1997).

A poluição do ar exerce um efeito comprovadamente negativo sobre a homeostase vascular e sobre parâmetros hemoreológicos. Estudos epidemiológicos como também experimentais conduzidos em humanos e animais mostram que a exposição a níveis elevados dos principais poluentes do ar provocam prejuízos ao sistema vascular tais como: vasosconstrição de grandes vasos, remodelamento das pequenas artérias pulmonares e coronarianas, aumento dos níveis circulantes de endotelina-1 entre outros (Lemos et al, 2006; Kaehler et al. 2002; Brook et al. 2002; Calderón-Garcidueñas et al. 2007).

As alterações observadas no cordão umbilical dos fetos do grupo nF2 podem ser consequência direta das alterações placentárias encontradas nestes animais e discutidas anteriormente, ou da exposição transplacentária aos poluentes.

As alterações observadas podem ser explicadas de duas maneiras:

1) A placenta, dos animais expostos durante a gestação, apresenta uma redução no volume dos espaços sanguíneos maternos, acompanhada de uma redução de 13% na área de superfície de troca, o que indica um aumento na resistência vascular e diminuição do fluxo de sangue para a placenta e conseqüentemente de oxigênio e nutrientes para o feto em crescimento. O endotélio é capaz de perceber as mudanças nas forças hemodinâmicas e sinais trazidos pelo sangue e responde através da liberação de substâncias vasoativas. Em resposta a este menor fluxo e a menor oferta de oxigênio, ocorreria um aumento dos níveis de estresse oxidativo e sinais hipóxicos e conseqüentemente da expressão de substâncias vasoativas^c, que levariam ao remodelamento do cordão e seus componentes (Michiels et al., 1994; Rose et al, 2002; Yang et al., 2002; Hall et al., 2004).

2) As alterações observadas no cordão também podem ser explicadas por uma ação direta dos poluentes presentes no ar e que sabidamente são capazes de atravessar a barreira placentária e vascular (PM_{2,5}, chumbo, cádmio, HPA) desencadeando danos resultantes da produção aumentada de espécies reativas de

^c *Os vasos umbilicais não apresentam inervação, assim a modulação do tonus vascular é controlada por substâncias vasoativas como a endotelina (ET-1).

oxigênio, inflamação e/ou da estimulação endotelial anormal, que levaria ao remodelamento vascular (Rajagopalan et al., 2005).

A expressão aumentada do receptor de endotelina está associada a algumas patologias vasculares e ao câncer. Sabe-se que a liberação aumentada de ET-1 e a expressão aumentada de ETAR estão associadas a efeitos de vasoconstrição e remodelamento vascular (Lerman et al., 1991; Nilsson et al., 2008).

O modelo utilizado para a avaliação não nos permite saber se as alterações são decorrentes de alteração placentária, ou de um efeito direto, mas o mais plausível é que estejam ocorrendo os dois processos ao mesmo tempo. Entretanto, os resultados mostram que o feto em desenvolvimento também está sujeito aos efeitos da exposição à poluição do ar, constatados pelas alterações vasculares observadas.

Achados recentes mostram que diversas doenças estão associadas à exposição a contaminantes ambientais que ocorrem ainda durante o período de vida intra-uterino; além de prejudicar o desenvolvimento estas exposições podem determinar a expressão ou repressão de genes essenciais em pontos críticos do desenvolvimento contribuindo para a ocorrência de doenças crônicas na vida adulta. (Dolinoy et al. 2007; Li et al. 2003; Yang et al. 2004).

Com base nos achados concluímos que as alterações morfofuncionais do cordão umbilical, bem como o desequilíbrio entre reguladores do tônus vascular e o estresse oxidativo na parede dos vasos umbilicais podem ser mecanismos associados ao comprometimento do desenvolvimento fetal.

9. CONCLUSÕES

Concluindo, nosso estudo demonstrou que a exposição aos níveis ambientais de poluição particulada do ar urbano na cidade de São Paulo:

- 1- Afeta negativamente diferentes funções e estágios do processo reprodutivo.
- 2- A exposição maternal prévia à gestação pode ser crítica para o desfecho gestacional
- 3- A exposição materna prévia à gestação e no início da gestação estão associadas a um risco aumentado de redução do peso fetal.
- 4- As alterações morfofuncionais da placenta afetam a porção materna da interface entre a mãe e o feto, e apesar do lado fetal melhorar o transporte por difusão passiva, o comprometimento do desenvolvimento persiste.
- 5- As alterações morfofuncionais do cordão umbilical, bem como o desequilíbrio entre reguladores do tônus vascular e o estresse oxidativo nos vasos umbilicais podem ser mecanismos associados ao comprometimento do desenvolvimento fetal

10. REFERÊNCIAS

Andrade MI. Identificação de fontes de matéria particulada do aerossol atmosférico de São Paulo. Tese de Doutorado. São Paulo: Instituto de Física da USP, 1993

Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding na endothelin receptor. *Nature*,1990; 348: 730-732.

Astrup H, Vestergaard. Transplacental transfer of environmental genotoxins- Polycyclic aromatic hydrocarbon- albumin in nonsmoking women. *Environ Health Perspect.* 1996; 104(Suppl 3):625-627.

AVMA. 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia *JAVMA.* 2001; 218(5).

Baddeley AJ, Gundersen HJ, Cruz-Orive LM. Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc.* 1986; 142:259-276.

Barbieri O, Ognio E, Rossi O, Astigiano S, Rossi L. Embryotoxicity of benzo(a)pyrene and some of its synthetic derivatives in Swiss mice. *Cancer Res.* 1986; 46:94-98.

Barker DJP. The fetal and infant origins of disease. *European Journal of Clinical Investigation*, 1995; 25:457–463.

Baskurt OK, Levi E, Caglayan S, Dikmenoglu N, Kutman MN. Hematological and hemorheological effects of air pollution. *Arch Environ Health* 1990; 45:224-228.

Batalha, JR; Saldiva PHN; Clarke, RW; Coull BA; Sterns RC; et al. Concentrated air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environ. Heath Perspect.* 2002; 115:1192-1197.

Bausero P, Ben-Mahdi M, Mazucatelli J, Bloy C, Perrot-Applanat M. Vascular endothelial growth factor is modulated in vascular muscle cells by estradiol, tamoxifen, and hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279: H2033–H2024.

Behrman, RE. Nelson textbook of pediatrics. 14th Ed. Philadelphia:Saunders, 1992.

Bhattacharyya MH, Whelton BD, Stern PH, Peterson DP. Cadmium accelerates bone loss in ovariectomized mice and fetal rat limb bones in culture. *Proc Nat Acad Sci(USA)*.1988; 85(22): 8761-5.

Bobak M, Leon DA. Air pollution and infant mortality in the Czech Republic, 1986-1988. *Lancet* . 1992; 340:1010-1014.

Bobak M, Leon DA. Pregnancy outcomes and outdoor air pollution: an ecological study in districts of the Czech Republic 1986–8. *Occup Environ Med.* 1999a; 56:539–543.

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

Bobak, M. Outdoor air pollution, low birth weight, and prematurity. *Environ Health Perspect.* 2000; 108:173-176.

Bohm GM, Saldiva PH, Pasqualucci CA, Massad E, Martins Mde E, Zin WA, Cardoso WV, et al. Biological effects of air pollution in Sao Paulo and Cubatão. *Environ Res.* 1989; 49(2):208-216.

Bolon B, Bucci TJ, Warbritton AR, Chen JJ, Mattison DR, Heindel JJ. Differential follicle counts as a screen for chemically induced ovarian toxicity in mice: results from continuous breeding bioassays. *Fundam Appl Toxicol.* 1997; 39:1-10.

Borman SM, Christian PJ, Sipes IG, Hoyer PB. Ovotoxicity in female Fischer rats and B6 mice induced by low-dose exposure to three polycyclic aromatic hydrocarbons: comparison through calculation of an ovotoxic index. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000; 167:191-198.

Braga AL, Saldiva PH, Pereira LA, Menezes JJ, Conceição GM, Lin CA, et al. Health effects of air pollution exposure on children and adolescent in São Paulo, Brazil. *Pediatr Pulmonol.* 2001; 31(2):106-113.

Brook RD, Brook JR, Rajagopalan S. Air pollution: the "Heart" of the problem. *Curr Hypertens Rep.* 2003; 5(1):32-39.

Browse NL, Burnand KG. The cause of venous ulceration. *Lancet.* 1982; 2:243-245.

Bruch JF, Sibony O, Benali K, Challier JC, Blot P, Nessmann C. Computerized microscope morphometry of umbilical vessels from pregnancies with intrauterine growth retardation and abnormal umbilical artery Doppler. *Hum Pathol* 1997; 28: 1139-1145.

Brunekreef B. Air pollution and life expectancy: is there a relation? *Occupational and Environmental Medicine.* 1997; 54:781-784.

Brunekreef B, Dockery DW, Krzyzanowski M. Epidemiologic studies on short term effect of low levels of major ambient air pollution components *Environ Health Perspect.* 1995; 103(Suppl 2):3-13.

Bui QQ, Tran MB, West WL. A comparative study of the reproductive effects of methadone and benzo(a)pyrene in the pregnant and pseudopregnant rat. *Toxicology.* 1986; 42:195-204.

Bulmer JN, Smith Morrison L, Wells M: Maternal and fetal cellular relationship in the human placental basal plate. *Placenta.* 1988; 9: 237-246.

Burton GJ, Watson AL, Hempstock J, Skepper JN, Jauniaux E Uterine glands provide histiotrophic nutrition for the human fetus during the first trimester of pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(6):2954-2959.

Calderón-Garcidueñas L, Vincent R, Mora-Tiscareño A, Franco-Lira M, Henríquez-Roldán C, Barragán-Mejía G, Garrido-García L, Camacho-Reyes L, Valencia-Salazar G, Paredes R, Romero L, Osnaya H, Villarreal-Calderón R, Torres-Jardón R, Hazucha MJ, Reed W. Elevated Plasma Endothelin-1 and Pulmonary Arterial Pressure in Children Exposed to Air Pollution *Environ Health Perspect.* 2007; 115(8):1248-1253.

Carter AM, Enders AC. Comparative aspects of trophoblast development and placentation. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004; 2(1):46.

CETESB, 2005. Caracterização das Estações da Rede Automática de Monitoramento da Qualidade do Ar na RMSP Estação Cerqueira César. CETESB 2005 Technical Report (<http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/relatorios.asp> accessed on 20 January, 2008).

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

Chen CP, Aplin JD. Placental extracellular matrix: gene expression, deposition by placental fibroblast and effects of oxygen. *Placenta.* 2003; 24:316-325.

Chen J, He L, Dinger B, Fidone S. Cellular mechanisms involved in rabbit carotid body excitation elicited by endothelin peptides. *Respir Physiol*. 2002; 121:13–23.

Chen J, He L, Dinger B, Stensaas L, Fidone S. Role of endothelin and endothelin A-type receptor in adaptation of the carotid body to chronic hypoxia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002; 282:L1314–1323

Chilvers DC, Peterson PJ. Global cycling of arsenic. In: Hutchinson TC, Meema KM (eds) *Lead, Mercury, Cadmium and Arsenic in the Environment*. Chichester: John Wiley e Sons, 1987; 279–303

Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Developmental dynamics of the definite mouse placenta assessed by stereology. *Biol Reprod*. 2004; 70:1806–1813.

Cohen AJ. Outdoor air pollution and lung cancer. *Environ Health Perspect*. 2000; 108:743–750.

Conceição GM, Miraglia SG, Kishi HS, Saldiva PH, Singer JM Air pollution and child mortality: a time-series study in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect*. 2001; 109(Suppl 3):347–350.

Cracowski JL, Tremel F, Marpeau C, Baguet JP, Stanke-Labesque, Mallion JM, Bessard G. Increased formation of 15-F₂t-isoprostane in patients with severe heart failure. *Heart*. 2000; 84: 439–440.

Cross JC, Hemberger M, Lu Y, Nozaki T, Whiteley K, Masutani M, Adamson SL. Trophoblast functions, angiogenesis and remodeling of the maternal vasculature in the placenta. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 187(1-2):207–212.

Cross JC, Simmons DG, Watson ED. Chorioallantoic morphogenesis and formation of the placental villous tree. *Ann N Y Acad Sci*. 2003; 995:84–93.

Cross JC, Werb Z, Fisher SJ. Implantation and the placenta: key pieces of the development puzzle. *Science*. 1994; 266(5190):1508–1518.

Cross JC. Formation of the placenta and extraembryonic membranes. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 857:23–32.

Cross JC. How to make a placenta: mechanisms of trophoblast cell differentiation in mice--a review. *Placenta*. 2005; 26 (Suppl A):S3–S9.

Dasenbrock C, Peters L, Creutzenberg O, Heinrich U. The carcinogenic potency of carbon particles with and without PAH after repeated intratracheal administration in the rat. *Toxicol. Lett*. 1996; 88:15–21.

Davenport, AP; Maguire, JJ. Is endothelin induced vasoconstriction mediated only by ETA receptor in humans? *Trends Pharmacol Sci*. 1994; 15:9–11.

Davidge ST. Oxidative stress and altered endothelial cell function in preeclampsia. *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16 (1):65–73.

Dearth RK, Hiney JK, Srivastava V, Burdick SB, Bratton GR, Dees WL. Effects of lead (Pb) exposure during gestation and lactation on female pubertal development in the rat. *Develop Reprod Toxicol*. 2002; 16(4):343–352.

Dejmek J, Selevan SG, Benes I, I., Solansky I, Sram RJ. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. *Environ Health Perspect*. 1999; 107:475–480.

Dejmek J, Solanský I, Benes I, Leníček J, Srám RJ. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. *Environ Health Perspect.* 2000; 108:1159-1164.

Delfino RJ, Sioutas C, Malik S. Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ Health Perspect* 2005; 113:934-946.

Deneke SM, Fanburg BL. Regulation of cellular glutathione. *Am J Physiol* 1989;257:L163–73.

Dockery DW; Pope CA III Xu, X et al. An association between air pollution and mortality in six US cities. *N. Eng. J. Med.* 1993; 329:1753-1759.

Dolinoy DC, Weidman JR, Jirtle RL. Epigenetic gene regulation: linking early developmental environment to adult disease. *Reprod Toxicol.* 2007; 23(3):297–307.

Dostál M, Hertz-Picciotto I, Wegienka G, Dejmek J, Skokanová V, Srám RJ. Parameters of cellular immunity in maternal and umbilical cord blood in relation to air pollution. Preliminary results of a pregnancy outcomes study NK. *Cas Lek Cesk.* 2000; 139(6):183-188.

Driscoll KE, Carter JM, Howard BW, Hassenbein DG, Pepelko W, Baggs RB, Oberdoster G. Pulmonary inflammation, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1996; 136: 372-380.

Ehinger B, Gennser G, Owman C, Persson H, and Sjöberg NO. Histochemical and pharmacological studies on amine mechanisms in the umbilical cord, umbilical vein and ductus venosus of the human fetus. *Acta Physiol Scand.* 1968; 72: 15–24.

Freitas C, Bremner SA, Gouveia N, Pereira LA, Saldiva PH. Hospital admissions and mortality: association with air pollution in Sao Paulo, Brazil, [1993 to 1997.]. *Rev Saude Publica.* 2004;38(6):751-757.

French RJ, Jones PJH. Role of vanadium in nutrition: metabolism, essentiality and dietary considerations. *Life Sci.* 1993; 52: 339–346

Fried G, Lin YA. Effects of endothelin, calcium channel blockade and EDRF inhibition on the contractility of human uteroplacental arteries. *Acta Physiol. Scand,* 1994; 151: 477-484.

Gauderman WJ, Gilliland GF, Vora H, Avol E, Stram D, McConnell R, Thomas D, Lurmann F, Margolis HG, Rappaport EB, Berhane K, Peters JM. Association between air pollution and lung function growth in southern California children. *Am J Resp Critical Care Med.* 2002; 166:76-84.

Genbacev O, Zhou Y, Ludlow JW, Fisher SJ. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science.* 1997; 277(5332):1669-1672.

Genbacev, O McMaster MT, Zdravkovic, Fisher, SJ. Disruption of oxygen regulated responses underlines pathological changes in the placentas of women who smoke during pregnancy. *Rep Toxicol.* 2003; 17:509-518.

Generoso WM, Rutledge JC, Cain KT, Hughes LA, Braden PW. Exposure of female mice to ethylene oxide within hours after mating leads to fetal malformation and death. *Mutat Res* 1987; 176:269-274.

Georgiades P, Ferguson-Smith AC, Burton GJ Comparative developmental anatomy of the murine and human definitive placentae. *Placenta.* 2002; 23(1):3-19.

Gindoff PR, Jewelewicz R. Reproductive potential in the older woman. *Fertil Steril.* 1986; 46:989-1001.

Goldberg MS, Burnett RT, Bailar JC 3rd, Tamblyn R, Ernst P, et al. Identification of persons with cardiorespiratory conditions who are at risk of dying from the acute effects of ambient air particles. *Environ Health Persp.* 2001; 109(Suppl. 4):487- 494.

Goodwin JW. The impact of the umbilical circulation on the fetus. *Am J Obstet Gynecol.* 1968; 100:461-471.

Gouveia N, Bremner SA, Novaes HM. Association between ambient air pollution and birth weight in São Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health.* 2004; 58: 11-17.

Gouveia N, Fletcher T. Time series analysis of all pollution and mortality: effects by cause, age and socioeconomic status. *J Epidemiol Community Health.* 2000; 54(10):750-755.

Gouveia N, Fletcher T. Respiratory diseases in children and outdoor air pollution in São Paulo, Brazil: a time series analysis. *Occup Environ Med.* 2000; 57(7): 477-483.

Goyer RA. Lead toxicity: current concerns. *Environ Health Perspect.* 1993; 100: 177-187.

Granström BW, Xu CB, Nilsson E, Vikman P, Edvinsson L. Smoking particles enhance endothelin A and endothelin B receptor-mediated contractions by enhancing translation in rat bronchi. *BMC Pulm Med.* 2006; 6:6-15.

Gundersen HJ, Jensen EB. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc.* 1987; 147(Pt 3):229-263.

Ha EH, Lee JT, Kim H, Hong YC, Lee BE, Park HS, Christiani DC. Infant susceptibility of mortality to air pollution in Seoul, South Korea. *Pediatrics.* 2003; 111(2): 284-290.

Ha, E.H., Hong, Y.C., Lee, B.E., Woo, B.H., Schwartz, J. and Christiani, D.C. Is air pollution a risk factor for low birth weight in Seoul? *Epidemiology.* 2001; 12:643-648.

Haegerstrand A, Hemsén A, Gillis C, Larsson, Lundberg J. Endothelin: presence in human umbilical vessels, high levels in fetal blood and potent constrictor effect. *Acta Physiol. Scand.* 1989; 137:541 - 542.

Hall SM, Hislop AA, Wu Z, Haworth SG. Remodelling of the pulmonary arteries during recovery from pulmonary hypertension induced by neonatal hypoxia. *J Pathol* 2004; 203: 575-583.

Han C, Liang X, Jing J. Study on the association and significance between trace elements and rectal cancer. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 1999; 20(3):166-169.

Hansen C, Neller A, Williams G, Simpson R. Maternal exposure to low levels of ambient air pollution and preterm birth in Brisbane, Australia. *BJOG.* 2006; 113(8):935-941.

Hartikainen-Sorri AL, Vuolteenaho O, Leppäluoto J, Ruskoaho H. Endothelin in umbilical artery vasospasm. *Lancet* 1991; 337:619.

Hassoun PM, Thappa V, Landman MJ, Fanburg BL. Endothelin 1: mitogenic activity on pulmonary artery smooth muscle cells and release from hypoxic endothelial cells. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1992; 199(2):165-170.

Hempstock J, Cindrova-Davies T, Jauniaux E, Burton GJ. Endometrial glands as a source of nutrients, growth factors and cytokines during the first trimester of human pregnancy: a morphological and immunohistochemical study. *Reprod Biol Endocrinol.* 2004; 20:58-72.

Hemsen A, Gillis C, Larsson O, Haegerstrand A, Lundberg JM. Characterization, localization and actions of endothelins in umbilical vessels and placenta of man. *Acta Physiol. Scand.*, 1991; 143:395-404.

Hirata Y; Emori, T; Eguchi, S; Kanno, K; Imai, T Oht; Marumo. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993; 91:1367-1173.

Hirshfield AN. Overview of ovarian follicular development: Considerations for the toxicologist. *Environ Mol Mutagen.* 1997; 29:10-15.

Holson JF, Nemec M.D, Stump DG, Kaufman LE, Lindstrom L, Varsho BJ. Significance reliability and interpretation of developmental and reproductive toxicity study findings. In: Hood, R. (Ed), *Developmental and Reproductive Toxicology: A practical approach.* Tylor e Francis, USA. 2005.pp. 329-424.

Hope BK. A global biogeochemical budget for vanadium. *Sci Total Environ* 1994; 141: 1-10.

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

Hoyer PB, Sipes IG, Assessment of follicle destruction in chemical-induced ovarian toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996; 36:307-331.

Huang HH, Meites J. Reproductive capacity of aging female rats. *Neuroendocrinology.* 1975;17: 289-295.

Hubel CA, Roberts JM, Taylor RN, Musci TJ, Rodgers GM, McLaughlin MK. Lipid peroxidation in pregnancy. New perspectives on preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161:1025-1034.

Hubel CA. Oxidative stress in the pathogenesis of preeclampsia. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222 (3):222-235.

Huynh M, Woodruff TJ, Parker JD, Schoendorf KC. Relationships between air pollution and preterm birth in California. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2006; 20:454-461.

ImageJ. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>

Järup L. 182 Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin.* 2003; 68:167-182.

Jasmin S, Tjalve H. Effects of sodium pyridinethione on the uptake and distribution of nickel, cadmium and zinc in pregnant and nonpregnant mice. *Toxicology* 1986; 38:327-329.

Jedrychowski W, Bendkowska I, Flak E, Penar A, Jacek R, Kaim I. Estimated risk for altered fetal growth resultating from exposure to fine particles during pregnancy: An epidemiologic prospective cohort study in Poland. *Environ Health Perspect.* 2004; 112(14):1398-1402.

Jingxian W, Wenzhong W, Henkelmann B, Li Y, Kettrup A, Schramm KW. Presence of estrogenic activity from emission of fossil fuel combustion as detected by a recombinant yeast bioassay. *Atmos Environ.* 2003; 37:3225-3235.

Joyce TJ, Grossman M, Goldman F. An assessment of the benefits of air pollution control: the case of infant health. *J Urban Econ.* 1989; 25:32-51.

Kaehler J, Sill B, Koester R, Mittmann C, Orzechowski HD, Muenzel T, Meinertz T. Endothelin-1 mRNA and protein in vascular wall cells is increased by reactive oxygen species. *Clin Sci (Lond)*. 2002; 103(Suppl 48):176S-178S.

Kaiglova A Reichrtova E, Adamcakova A Wsolovs L Lactate dehydrogenase activity in human placenta following exposure to environmental pollutants. *Physiol Res*. 2001; 50:525-528.

Kaiser R, Romieu I, Medina S, Schwartz J, Krzyzanowski M, Kunzli N. Air pollution attributable postneonatal infant mortality in U.S. metropolitan areas: a risk assessment study. *Environ Health*. 2004; 3(1):4-9.

Kannan S, Misra DP, Dvonch JT, Krishnakumar A. Exposures to airborne particulate matter and adverse perinatal outcomes: a biologically plausible mechanistic framework for exploring potential effect modification by nutrition. *Environ Health Perspect*. 2006; 114(11):1636-1642.

Katsouyanni K, Touloumi G, Samoli E, et al. Confounding and effect modification in short term effects of ambient particles on total mortality. *Epidemiology*. 2001; 12:521-531.

Kaufman MH. *The Atlas of Mouse Development*. Academic Press, 1992.

Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* 2004; 25: 114-126.

Kay HH, Robinette B, Shin YY, Siew P, Shellhaas CS, Tyrey L. Placental villous glucose metabolism and hormone release respond to varying oxygen tensions. *Soc Gynecol Investig*. 1997; 4(5):241-246.

King TS, Canez MS, Gaskill S, Javors MA, Schenken RS Chronic cocaine disruption of estrous cyclicity in the rat: dose-dependent effects. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993; 264(1):29-34.

Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92:35-43.

Knight JA, Marrett LD. Parental Occupational Exposure and the Risk of Testicular Cancer in Ontario. *Occup Environ Med*. 1997; 39:333-338.

Knottnerus JA, Delgado LR, Knipschild PG, Essed GG, Smits F. Haematologic parameters and pregnancy outcome. A prospective cohort study in the third trimester. *J Clin Epidemiol* 1990; 43:461-466.

Kohnen G, Mackenzie F, Collet GP, Campbell AP, Davenport AD, Cameron AD, Cameron IT. Differential distribution of endothelin receptor subtypes in placentas from normal and growth restricted pregnancies. *Placenta*. 1997; 18:173-180.

Kok TMCM, Driece HAL, Hogervorst JGF, Briede JJ. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. *Mut Res*. 2006; 613:103-122.

Korpela H, Loueniva R, Yrjanheikki E, Kauppila A. Related Articles, Links Lead and cadmium concentrations in maternal and umbilical cord blood, amniotic fluid, placenta, and amniotic membranes. *Am J Obstet Gynecol*. 1986; 155(5):1086-9.

Lacsaña M, Esplugues A, Ballester F. Exposure to ambient air pollution and prenatal and early childhood health effects. *Europ J Epidemiol*. 2005; 20: 183–199.

Lave LB, Seskin EP. Air pollution, climate, and home heating: their effects on U.S. mortality rates. *Am J Public Health*. 1972; 62:909–916.

Lee BE, Ha EH, Park HS, Kim YJ, Hong YC, Kim H, Lee JT. Exposure to air pollution during different gestational phases contributes to risks of low birth weight. *Hum Reprod.* 2003; 18(3):638-643.

Lemos M, Lichtenfels AJ, Amaro Junior E, Macchione M, Martins MA, King M, Bohm GM, Saldiva PH. Quantitative pathology of nasal passages in rats exposed to urban levels of air pollution. *Environ Res.* 1994; 66(1):87-95.

Lemos M, Mohallem SV, Macchione M, Assunção JV, Godleski JJ, Saldiva PHN. Chronic exposure to urban air pollution induces structural alterations in murine pulmonary and coronary arteries. *Inhal. Toxicol.* 2006; 18:247-253.

Leonard A, Gerber GA, Jacquets P, Lauwerys RR. Carcinogenicity, mutagenicity and teratogenicity of industrially used metals. In: Kirsch-Volders M (ed.) *Mutagenicity, Carcinogenicity and Embryotoxicity of Industrial Pollutants*. Plenum Press, New York, 1984.

Lerman A, Edwards BS, Hallett JW, Heublein DM, Sandberg SM, Burnett JC. Circulating and tissue endothelin immunoreactivity in advanced atherosclerosis. *NEJM.* 1991; 325:997-1001.

Levin A, Miller RK. Fetal toxicity of cadmium in the rat: decreased utero-placental blood flow. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1981; 58:297-306.

Levin B, Kline J, Stein Z, Susser M, Warburton D. Epidemiologic detection of low dose effects on the developing fetus. *Environ Health Perspect.* 1981; 42:119-126.

Li S, Hursting SD, Davis BJ, McLachlan JA, Barrett JC. Environmental exposure, DNA methylation, and gene regulation: lessons from diethylstilbesterol-induced cancers. *Ann NY Acad Sci.* 2003; 983:161-169.

Lichtenfels AJ, Gomes JB, Pieri PC, El Khouri Miraglia SG, Hallak J, Saldiva PH. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil. *Fertil Steril.* 2007; 87(1):230-232.

Lin CA, Amador Pereira LA, de Souza Conceicao GM, Kishi HS, Milani R Jr, Ferreira Braga AL, Nascimento Saldiva PH. Association between air pollution and ischemic cardiovascular emergency room visits. *Environ Res.* 2003; 92(1):57-63.

Lin CA, Martins MA, Farhat SC, Pope CA 3rd, Conceicao GM, Anastacio VM, et al. Air pollution and respiratory illness of children in Sao Paulo, Brazil. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 1999;13(4):475-88.

Lin CA, Pereira LA, Nishioka DC, Conceicao GM, Braga AL, Saldiva PH.. Air pollution and neonatal deaths in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2004; 37(5):765-770.

Lipfert FW, Zhang J, Wyzga RE. Infant mortality and air pollution: a comprehensive analysis of US data for 1990. *J Air Waste Manage Assoc.* 2000; 50:1350-1366.

Liu S, Krewski D, Shi Y, Chen Y, Burnett RT. Association between gaseous ambient air pollutants and adverse pregnancy outcomes in Vancouver, Canada. *Environ Health Perspect.* 2003; 111(14):1773-1778.

Longo LD. Carbon monoxide: effects on oxygenation of the fetus in utero. *Science.* 1976; 194(4264):523-525.

Longo LD. The biological effects of carbon monoxide on the pregnant woman, fetus, and newborn infant. *Am J Obstet Gynecol.* 1977; 129(1):69-103.

Macchione M, Oliveira AP, Gallafrio CT, Muchao FP, Obara MT, Guimaraes ET, Artaxo P, et al. Acute effects of inhalable particles on the frog palate mucociliary epithelium. *Environ Health Perspect.* 1999; 107(10):829-833.

Maisonet M, Bush TJ, Correa A, Jaakkola JJK. Relation between ambient air pollution and low birth weight in the Northeastern United States. *Environ Health Perspect.* 2001; 109 (Suppl):S351-S356.

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; 95(1):106-115.

Mandegar M, Fung YC, Huang W, Remillard CV, Rubin LJ, Yuan JX. Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res.* 2004; 68: 75–103.

Mannes T, Jalaludin B, Morgan G, Lincoln D, Sheppard V, Corbett S. Impact of ambient air pollution on birth weight in Sydney, Australia. *Occup Environ Med.* 2005; 62(8):524-530.

Mas A, Holt D, Webb M. The acute toxicity and teratogenicity of nickel in pregnant rats. *Toxicology*, 1985; 35: 47 -51.

Mattison DR, Nightingale MS, Shiromizu K. Effects of toxic substances on female reproduction. *Environ. Health Perspect.* 1983; 48, 43-52.

Mattison DR, Thomford PJ. The mechanisms of action of reproductive toxicants. *Toxicol Pathol.* 1989; 17, 364-376.

Mattison DR. 1985. Clinical manifestations of ovarian toxicity. In: Dixon RL (ed) *Reproductive toxicology*. Raven, New York, pp 109–130

Mattison DR. The effects of smoking on fertility from gametogenesis to implantation. *Environ Res.* 1982; 28, 410-433.

Mayhew TM, Jackson MR, Boyd PA. Changes in oxygen diffusive conductances of human placentae during gestation (10-41 weeks) are commensurate with the gain in fetal weight. *Placenta* 1993; 14:51-61.

Mayhew TM, Ohadike C, Baker PN, Crocker IP, Mitchell C, Ong SS. Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction. *Placenta* 2003; 24:219-226.

Mayhew TM. Stereology and the placenta: where's the point? – a review. *Placenta* 27 (Suppl A), *Troph Res* 2006; 27:S17-S25.

Mayhew TM. Taking tissue samples from the placenta: an illustration of principles and strategies. *Placenta.* 2008; 29:1-14.

McQueen J, Kingdom JGP, Connel JMC, Whittle MJ. Fetal endothelin levels and placental vascular endothelin receptor in IUGR. *Obst Gynecol.* 1993; 82:992-998.

Michiels C, De Leener F, Arnould T, Dieu M, Remacle J. Hypoxia stimulates human endothelial cells to release smooth muscle cell mitogens: role of prostaglandins and bFGF. *Exp Cell Res.* 1994; 213:43–54.

Mildenberger E, Siegel G, and Versmold HT. Oxygen-dependent regulation of membrane potential and vascular tone of human umbilical vein. *Am J Obstet Gynecol*. 1999; 181: 696–700.

Mildenberger, E.; Biesel, B. Siegel, G.; Versmold, HT. Nitric oxide and endothelin in oxygen-dependent regulation of vascular tone of human umbilical vein. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285: H1730–H1737.

Miller KP, Borgeest C, Greenfeld C, Tomic D, Flaws JA. In utero effects of chemicals on reproductive tissues in females. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004; 198 :111–131.

Milton AH, Smith W, Rahman B, Hasan Z, Kulsum U, Dear K, Rakibuddin M, Ali A. Chronic arsenic exposure and adverse pregnancy outcomes in Bangladesh. *Epidemiology*. 2005; 16(1):82-86.

Miraglia, S.G. E. Análise do impacto do consumo de diferentes combustíveis na incidência de mortalidade por doenças respiratórias no município de São Paulo. Dissertação de Mestrado. São Paulo, Escola Politécnica-USP, 1997.

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

Mohorovic L. First two months of pregnancy- critical time for preterm delivery and low birthweight caused by adverse effects of coal combustion toxics. *Early Human Dev*. 2004; 80:115-123.

Mohorovic L. The level of maternal methemoglobin during pregnancy in an air-polluted environment. *Environ Health Perspect*. 2003; 111(16):1902-1905.

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

Morgan AM, El-Tawil OS Effects of ammonium metavanadate on fertility and reproductive performance of adult male and female rats.: *Pharmacol Res*. 2003; 47(1):75-85.

Morrissey RE, Lamb JC 4th, Schwetz BA, Teague JL, Morris RW. Association of sperm, vaginal cytology, and reproductive organ weight data with results of continuous breeding reproduction studies in Swiss (CD-1) mice. *Fundam Appl Toxicol*. 1988; 11(2):359-371.

Morrissey RE, Schwetz BA, Lamb JC 4th, Ross MD, Teague JL, Morris RW Evaluation of rodent sperm, vaginal cytology, and reproductive organ weight data from National Toxicology Program 13-week studies. *Fundam Appl Toxicol*. 1988; 11(2):343-358.

Müntener, M; Hsu, Yu-Chih. Development of trophoblast and placenta of the mouse. *Acta Anat*. 1977; 98:241-252.

Muller G, Catar RA, Niemann B, Barton M, Knels L, Wendel M, Wietz HM. Upregulation of Endothelin Receptor B in Human Endothelial Cells by Low-Density Lipoproteins *Exp Biol Med* (Maywood). 2006; 231:766-771.

Myatt L; Cui X. Oxidative stress in the placenta. *Histochem. Cell Biol*. 2004; 122:369-382.

Nelson JF, Felicio LS, Randall PK, Sims C, Finch CE. A longitudinal study of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: I. Cycle frequency, length and vaginal cytology. *Biol Reprod*. 1982; 27: 327-339.

Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation*. 2002; 105: 411–414.

Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PH, Dinsdale D, Smith T, Xu H, Vermeylen J, Nemery B. Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model. *Am J Resp Crit Care Med*. 2002; 166: 998–1004.

Nikula KJ, Snipes MB, Barr EB, Griffith WC, Henderson RF, Mauderly JL. Comparative pulmonary toxicities and carcinogenicities of chronically inhaled diesel exhaust and carbon black in F344 rats. *Fund Appl Toxicol*. 1995; 25:80-94.

Nilsson D, Wackenfors A, Gustafsson L, Edvinsson L, Paulsson P, Ingemansson R, Malmjö M. Increased ET(A) and ET(B) receptor contraction in the left internal mammary artery from patients with hypertension. *J Hum Hypertens*. 2008; 22(3):226-229.

Nisell H, Hemsén A, Lunell NO, Wolff K, Lundberg JM. Maternal and fetal levels of a novel polypeptide, endothelin: evidence for release during pregnancy and delivery. *Gynaecol Obstet Invest*. 1990; 30:129- 132.

Nonaka-Sarukawa M, Yamamoto K, Aoki H, Takano H, Katsuki T, Ikeda U, Shimada K. Increased urinary 15-F_{2t}-isoprostane concentrations in patients with non-ischaemic congestive heart failure: a marker of oxidative stress. *Heart*. 2003; 89:871–874.

Nriagu JO, Pacyna JM. Quantitative assessment of worldwide contamination of air, water and soil by trace metals. *Nature*. 1988; 333:134–9.

Oberdorster G, Ferin J, Lehnert BE. Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ Health Perspect*. 1994; 102 (Suppl 5):173-179.

O'Halloran K, Spickett JT. The interaction of lead exposure and pregnancy. *Asia Pac J Public Health*. 1992; 6(2):35-39.

Oliver C, Montes MJ, Galindo JA, Ruiz C, Olivares EG. Human decidual stromal cells express alpha-smooth muscle actin and show ultrastructural similarities with myofibroblasts. *Hum Reprod*. 1999; 14(6):1599-1605.

Osmond C, Baker DJP. Fetal, infant and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect*. 2000; 18:545–553.

Papadopoulos F, Spinelli M, Valente S, Foroni L, Orrico C, Alviano F, Pasquinelli G. Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using ImageJ. *Ultrastruct Pathol*. 2007; 31(6):401-407.

Pekkanen J, Brunner EJ, Anderson HR, Tiittanen P, Atkinson RW. Daily concentrations of air pollution and plasma fibrinogen in London. *Occup Environ Med* 2000; 57:818-822.

Penna MLF, Duchie MP. Air pollution and infant mortality from pneumonia in the Rio de Janeiro metropolitan area. *Bull Pan Am Health Org*. 1991; 25:47–54.

Pereira LA, Loomis D, Conceição GM, Braga AL, Arcas RM, Kishi HS, Singer JM, Böhm GM, Saldiva PH. Association between air pollution and intrauterine mortality in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect* 1998; 106(6):325-329.

Perera FP, Hemminki K, Gryzbowska E, Motykiewicz G, Michalska J, Santella RM, Young TL, Dickey C, Brandt-Rauf P, De Vivo I, et al. Molecular and genetic damage from environmental pollution in Poland. *Nature*. 1992; 360:256-258.

Perera FP, Whyatt RM, Jedrychowski W, Rauh V, Manchester D, Santella RM, Ottman R. Recent developments in molecular epidemiology. A study of the effects of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons on birth outcomes in Poland. *Am J Epidemiol*. 1998; 147:309-314.

Peters A, Döring A, Wichmann HE, Koenig W. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet* 1997; 349:1582–1587.

Pollak A, Binder R, Vycudilik W The umbilical cord blood lead concentration: a comparison between an urban and rural population (author's transl) *Wien Klin Wochenschr*. 1976; 88(17):567-569.

Pope CA 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J Am Med Assoc*. 2002; 287:1132–1141.

Pope CA 3rd, Thun MJ, Namboodiri MM, Dockery DW, Evans JS, Speizer FE, Heath CW Jr. Particulate air pollution as predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995; 151:669-674.

Pope CA, Dockery DW. Acute health effects of PM10 pollution and symptomatic and asymptomatic children. *Am. Rev. Respir. Dis*. 1992; 145: 1123-1128.

Praticò D, Reilly M, Lawson JA, FitzGerald GA. Novel indices of oxidant stress in cardiovascular disease: specific analysis of F2-isoprostanes. *Agents Actions Suppl*. 1997; 48:25-41.

Qureshi F, Jacques SM. Marked segmental thinning of the umbilical cord vessels. *Arch Pathol Lab Med* 1994; 118:826–830.

Raio L, Ghezzi F, Di Naro E, Duwe DG, Cromi A, Schneider H. Umbilical cord morphologic characteristics and umbilical artery Doppler parameters in intrauterine growth-restricted fetuses. *J Ultrasound Med* 2003; 22: 1341–1347.

Raio L, Ghezzi F, Di Naro E, Franchi M, Bolla D, Schneider H. Altered sonographic umbilical cord morphometry in early-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol*. 2002; 100:311–316.

Rajagopalan S; Sun Q, Chen LC. Particulate Pollution and Endothelial Function. *Déjà Vu All Over Again in the Air. Circulation*. 2005; 111:2869-2871.

Reichrtova E, Dorociak F, Palkovicova L. Sites of lead and nickel accumulation in the placental tissue. *Human Expl Toxicol*. 1998; 17(3):176-181.

Rey S, Corthorn J, Chaco´ C, Iturriaga R. Expression and Immunolocalization of Endothelin Peptides and Its Receptors, ETA and ETB in the Carotid Body Exposed to Chronic Intermittent Hypoxia. *J Histochem Cytochem*. 2007; 55(2):167-174.

Reynolds LP, Redmer DA. Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci*. 1995; 73:1839-1851.

Ribeiro H, Cardoso MR. Air pollution and children's health in Sao Paulo (1986-1998). *Soc Sci Med*. 2003; 57(11): 2013-2022.

Risom L, Moller P, Loft S. Oxidative stress induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* 2005; 592:119-137.

Ritz B, Chapa G, Fruin S. Effect of air pollution on preterm brth among children born in Southern California between 1989 and 1993. *Epidemiology*. 2000; 11:502-511.

Ritz B, Wilhelm M, Hoggatt KJ, Ghosh JK. Ambient air pollution and preterm birth in the environment and pregnancy outcomes study at the University of California, Los Angeles. *Am J Epidemiol*. 2007; 166(9):1045-1052.

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

Rivero DH, Soares SR, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, Dolhnikoff M, Saldiva PH. Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of São Paulo, Brazil. *Toxicol Sci* 2005; 85:898-905.

Rocha, JES Matheus M; Sala, MA Effects of cigarette smoke on human placenta morphometry. *Int J Gynecol Obst.* 1998; 62: 237-242.

Rogers JF, Thompson SJ, Addy CL, McKeown RE, Cowen DJ, Decouflé P. Association of very low birth weight with exposures to environmental sulfur dioxide and total suspended particulates. *Am J Epidemiol*. 2000; 151(6):602-613.

Rojas A, Figueroa H, Re L, Morales MA. Oxidative stress at the vascular wall. Mechanistic and pharmacological aspects. *Arch Med Res.* 2006; 37(4):436-448.

Rose F, Grimminger F, Appel J et al. Hypoxic pulmonary artery fibroblasts trigger proliferation of vascular smooth muscle cells: role of hypoxia-inducible transcription factors. *FASEB J.* 2002; 16: 1660–1661.

Rowe T. Fertility and a woman's age. *J Reprod Med.* 2006; 51:157-163.

Rutherford RAD, Wharton J, McCarthy A, Gordon L, Sullivan MHF, Elder MG, Polak JM. Differential localization of endothelin Eta ETb binding sites in human placenta. *British J Pharmacol.* 1993; 109: 544-522.

Rutland CS, Latunde-Dada AO, Thorpe A, Plant R, Langley-Evans S, Leach L. Effect of gestational nutrition on vascular integrity in the murine placenta. *Placenta* 2007; 28:734-742.

Rutland CS, Mukhopadhyay M, Underwood S, Clyde N, Mayhew TM, Mitchell CA. Induction of intrauterine growth restriction by reducing placental vascular growth with the angioinhibin TNP470. *Biol Reprod.* 2005; 73:1164-1173.

Rutledge JC. Developmental toxicity induced during early stages of mammalian embryogenesis. *Mutat Res.* 1997; 396:113-127.

Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of cDNA encoding a non isopeptide selective subtype of endothelin receptor. *Nature.* 1990; 348:732-735.

Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Diaz E, Koutrakis P, Suh H, Tsuda A, Godleski JJ Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165 (12):1610-1617.

Saldiva PH, Lichtenfels AJ, Paiva PS, Barone IA, Martins MA, et al. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: a preliminary report. *Environ Res.* 1994; 65(2):218-225.

Sallmen M, Lindbolum ML, Anttila A, Taskinen H, Hemminki K. Paternal occupational lead exposure and congenital malformations. *J Epidemiol Community Health.* 1992; 46(5): 519-522.

Saric M. Reproduction and exposure to lead. *Ann Acad Med (Singapore).* 1984; 13(2): 383-388.

Saylam C, Ozdemir N, Itil IM, Sendag F, Terek MC. Distribution of fibronectin, laminin and collagen type IV in the maternal-fetal boundary zone of the developing mouse placenta *Arch Gynecol Obstet.* 2002; 266:83-85.

Scalera F, Dittrich R, Beckmann MW, Beinder E. Effect of endothelin-1 on intracellular glutathione and lipid peroxide availability and on the secretion of vasoactive substances by human umbilical vein endothelial cells. *European J Clinical Invest.* 2002; 32:556–562.

Schwartz J, Neas LM. Fine particles are more strongly associated than coarse particles are with the acute respiratory health effects in schoolchildren. *Epidemiology.* 2000; 11: 6-10.

Schwartz J. Harvesting and long term exposure effects in the relation between air pollution and mortality. *Am J Epidemiol.* 2000; 151: 440-448.

Seaton A, MacNee W, Donaldson K, Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet.* 1995; 345:176-178.

Selevan SG, Borkovec L, Slott VL, Zudová Z, Rubes J, Evenson DP, Perreault SD. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect.* 2000; 108(9):887-894

Sexton AJ, Turmaine M, Cai WQ, and Burnstock G. A study of the ultrastructure of developing human umbilical vessels. *J Anat.* 1996; 188: 75–85.

Sharara FI, Seifer DB, Flaves JA. Environmental toxicants and female reproduction. *Fertil Steril.* 1998; 70(4): 613-622.

Shaw GM, Gold EB. Methodological considerations in the study of parental occupational exposures and congenital malformations in offspring. *Scand J Work Environ Health.* 1998; 14: 344-355.

Sherer DM, Abulafia O. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. *Placenta* 2001; 22: 1-13.

Shinkura R, Fujiyama C, Akiba S. Relationship between ambient sulfur dioxide levels and neonatal mortality near the Mt. Sakurajima volcano in Japan. *J Epidemiol.* 1999; 9:344–349.

Sih T. Correlation between respiratory alteration and respiratory disease due to urban pollution. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 1999; 49 (Suppl 1): 261-267.

Silbergeld EK, Patrick TE. Environmental exposures, toxicologic mechanisms, and adverse pregnancy outcomes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 2005; 192: 11–21.

Slama R, Morgenstern V, Cyrus J, Zutavern A, Herbarth O, Wichmann HE, Heinrich J; LISA Study Group. Traffic-related atmospheric pollutants levels during pregnancy and offspring's term birth weight: a study relying on a land-use regression exposure model. *Environ Health Perspect.* 2007; 115(9):1283-1292.

Smith AB, Jones MM, Singh PK, James SG, Gale GR, Atkins LM, Smith AB. Structure-activity relationships for in vivo cadmium mobilization by dithiocarbamates derived from lactose and maltotriose. *Chemical Res Toxicol*. 1991; 4(6): 692-698.

Sonawane BR, Nordberg M, Nordberg GF, Lucier GW. Placental transfer of cadmium in rats: influence of dose and gestational age. *Environ Health Perspect*; 1975; 12: 97-102.

Sørensen M, Daneshvar B, Hansen M, Dragsted LO, Hertel O, Knudsen L, Loft S. Personal PM2.5 exposure and markers of oxidative stress in blood. *Environ Health Perspect* 2003; 111:161-166.

Souza MB, Saldiva PHN, Pope CA, Capelozzi VL. Respiratory changes due to long term exposure to urban levels of air pollution: a histopathologis study in humans. *Chest*. 1998; 113: 1312-1318.

Squadrito GL, Cueto R, Dellinger B, Pryor WA. Quinoid redox cycling as a mechanism for sustained free radical generation by inhaled airborne particulate matter. *Free Radic Biol Med*. 2001; 31(9):1132-1138.

Sram RJ, Binkova B, Rossner P, Rubes J, Topinka J, Dejmek J. Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens *Mutat Res*. 1999; 428(1-2):203-15.

Sun Y, Arbuckle S, Hocking G, Billson V. Umbilical cord stricture and intrauterine fetal death. *Pediatr Pathol Lab Med*. 1995; 15:723-732.

Sunderman FW, Shen, SK, Reid MC, Allpass PR. Teratogenicity and embryotoxicity of nickel carbonyl in Syrian hamsters. *Teratogenicity, Carcinogenicity and Mutagenicity*. 1980; 1: 223-231.

Tabacova S, Little RE, Balabaeva L. Maternal exposure to exogenous nitrogen compounds and complications of pregnancy. *Arch Environ Health*. 1997; 52: 341-347.

Topinka J, Binkova B, Mrackova G, Stavkova Z, Peterka V, Benes I, Dejmek J, et al.. Influence of GSTM1 and NAT2 genotypes on placental DNA adducts in an environmentally exposed population. *Environ Mol Mutagen*. 1997; 30: 184-195.

U.S. EPA., 1996. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum, Washington, DC, 630/R-96/009, 1996. Available from: <http://www.epa.gov/NCEA/raf/pdfs/devtox.pdf>

Utell MJ, Frampton MW. Acute health effects of ambient air pollution: The ultrafine particle hypothesis. *J Aerosol Med*. 2000; 13: 355-359.

Vinitketkumnuen U, Kalayanamitra K, Chewonarin T, Kamens R. Particulate matter, PM 10 e PM 2.5 levels, and airborne mutagenicity in Chiang Mai, Thailand. *Mutat Res*. 2002; 519(1-2):121-131.

Wang X, Ding H, Ryan L, Xu X. Association between air pollution and low birth weight: a community-based study. *Environ Health Perspect*. 1997; 105(5):514-520.

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

Watson ED, Cross JC Development of structures and transport functions in the mouse placenta. *Physiology*. 2005; 20:180-193.

Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions of the mouse placenta. *Physiology* 2005; 20:180-193.

Webster, W.S. Chronic cadmium exposure during pregnancy in the mouse influence of exposure levels on fetal and maternal uptake. *J Toxicol Environ Health*. 1998; 24(2): 183-192.

Weissman A, Jakobi P, Bronshtein M, Goldstein I. Sonographic measurements of the umbilical cord and vessels during normal pregnancies. *J Ultrasound Med* 1994; 13:11–14.

Weissman A, Jakobi P. Sonographic measurements of the umbilical cord in pregnancies complicated by gestational diabetes. *J Ultrasound Med*. 1997; 16: 691–694.

Whelton BD, Bhattacharyya MH, Carnes BA, Moretti ES, Peterson DP. Female reproduction and pup survival and growth for mice fed a cadmium-containing purified diet through six consecutive rounds of gestation and lactation. *J Toxicol Environ Health* 1988; 24:321–343.

WHO. 1992. International statistical classification of diseases and related health problems, tenth revision, World Health Organization, Geneva, 1992

WHO. 1995. Inorganic Lead Environmental Health Criteria, vol 165. Geneva: World Health Organization, 1995.

WHO. 2003. Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide. Report on a WHO Working Group Bonn, Germany 13–15 January 2003 Available from: <http://www.euro.who.int/document/e79097.pdf>

WHO European Centre for Environment and Health, 2005. Effects of air pollution on children's health and development- a review of the evidence. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 2005. Available from: <http://www.euro.who.int/document/E86575.pdf>

Wide M. Lead exposure on critical days of fetal life affects fertility in the female mouse. *Teratology*. 1995; 32(3):375-380.

Wiebe JP, Barr KJ. Effect of prenatal and neonatal exposure to lead on the affinity and number of estradiol receptors in the uterus. *J Toxicol Environ Health*. 1998; 24(4): 451-60.

Wier PJ, Miller RK, Maulik D. Toxicity of cadmium in the human perfused placenta. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1990; 105: 156-171.

Wilkes BM; Mento, PF; Hollander AM; Maita, ME; Sung, S; Giradi, EP. Endothelin receptor in human placenta: relationship to vascular resistance and thromboxane release. *Am J Physiol*. 1990; 258: 864-870.

Woodruff TJ, Grillo J, Schoendorf KC. The relationship between selected causes of postneonatal infant mortality and particulate air pollution in the United States. *Environ Health Perspect*. 1997; 105:608–612.

Woodruff TJ, Parker JD, Kyle AD, Schoendorf KC. Disparities in exposure to air pollution during pregnancy. *Environ Health Perspect*. 2003;111(7):942-946.

Xu X, Ding H, Wang X. Acute effects of total suspended particles and sulfur dioxides on preterm delivery: a community-based cohort study. *Arch Environ Health*. 1995; 50:407–415.

Xu Y, Xiao R, Li Y. Effect of ethanol on the development of visceral yolk sac. *Hum Reprod*. 2005; 20(9):2509-2516.

Yang X, Sheares KK, Davie N, Upton PD, Taylor GW, Horsley J, Wharton J, Morrell NW. Hypoxic induction of cox-2 regulates proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002; 27: 688–696.

Yang Z, Knight CA, Mamerow MM, Vickers K, Penn A, Postlethwait EM, et al. Prenatal environmental tobacco smoke exposure promotes adult atherogenesis and mitochondrial damage in apolipoprotein E–/– mice fed a chow diet. *Circulation*. 2004; 110(24):3715–3720.

Ziaei S, Nouri K, Kazemnejad A. Effects of carbon monoxide air pollution in pregnancy on neonatal nucleated red blood cells. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2005; 19(1):27-30.

Zondervan HA, Oosting J, Smorenberg-Schoorl ME, Treffers PE. Maternal whole blood viscosity in pregnancy hypertension. *Gynecol Obstet Invest*. 1988; 25:83-88.

Apêndice I- Trabalho publicado

Particulate Urban Air Pollution Affects the Functional Morphology of Mouse Placenta

*Mariana Matera Veras^{1,2}, Nilsa Regina Damaceno-Rodrigues², Elia Garcia Caldini², Antonio A.C.Maciel Ribeiro³, Terry M. Mayhew⁴, Paulo H.N. Saldiva¹ and Marisa Dolhnikoff¹. Biol. Reprod. 2008; May.

BOR Papers in Press. Published on May 28, 2008 as DOI:10.1095/biolreprod.108.069591

**BOR Papers in Press. Published on May 28, 2008 as
DOI:10.1095/biolreprod.108.069591**

Copyright 2008 by The Society for the Study of Reproduction.

MS ID#: BIOLREPROD/2008/069591

Particulate Urban Air Pollution Affects the Functional Morphology of Mouse Placenta

*Mariana Matera Veras^{1,2}, Nilsa Regina Damaceno-Rodrigues², Elia Garcia Caldini², Antonio A.C. Maciel Ribeiro³, Terry M. Mayhew⁴, Paulo H.N. Saldiva¹ and Marisa Dolhnikoff¹

(1)Laboratory of Experimental Air Pollution (LIM05), Department of Pathology, School of Medicine, University of São Paulo, School of Medicine, Avenida Doutor. Arnaldo, 455, sala 1155, Cerqueira Cesar, Zip Code 01246-903, São Paulo, Brazil.

(2)Laboratory of Cell Biology (LIM59), Department of Pathology, School of Medicine, University of São Paulo, School of Medicine, Avenida Doutor. Arnaldo, 455, sala 4309, Cerqueira Cesar, Zip Code 01246-903, São Paulo, Brazil.

(3)Laboratory of Stochastic Stereology and Chemical Anatomy, Department of Surgery, College of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Avenida Professor Doutor Orlando Marques de Paiva 87, Zip code 05508-000, São Paulo, Brazil

(4)Centre for Integrated Systems Biology and Medicine, School of Biomedical Sciences, E Floor, Queen's Medical Centre, University of Nottingham, NG7 2UH, Nottingham, UK

***Corresponding author:** Mariana Matera Veras, PhD, Dept of Pathology, Laboratory of Experimental Air Pollution (LIM 05), University of São Paulo, School of Medicine, Avenida Doutor Arnaldo, 455, room 1155, Cerqueira Cesar, Zip Code: 01246-903, São Paulo, Brazil.
Email: verasine@usp.br; Phone: + 55-11 30617377 Fax: + 55-11- 30628098

Grant support: This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 05/548573 and # 03/107729), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and by Laboratório de Investigações Médicas LIM05 and LIM59 HC-FMUSP.

Key words: air pollution, mouse, placenta, stereology, oxygen diffusive conductance

Abbreviations: Coefficient of variation (CV); intrauterine growth restriction (IUGR); low birth weight (LBW); polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); systematic uniform random (SUR); decidua basalis (Db); chorionic plate (Cp); junctional zone (Jz); labyrinth (Lab)

ABSTRACT

In humans, adverse pregnancy outcomes (low birthweight, prematurity, intrauterine growth retardation) are associated with exposure to urban air pollution. Experimental data have also shown that such exposure elicits adverse reproductive outcomes. We hypothesized that the effects of urban air pollution on pregnancy outcomes could be related to changes in functional morphology of the placenta. To test this, future dams were exposed during pre-gestational and gestational periods to filtered or non-filtered air in exposure chambers. Placentas were collected from near-term pregnancies and prepared for microscopical examination. Fields of view on vertical uniform random tissue slices were analysed using stereological methods. Volumes of placental compartments were estimated and the labyrinth analysed further in terms of its maternal vascular spaces, fetal capillaries, trophoblast and exchange surface areas. From these primary data, secondary quantities were derived: vessel calibres (expressed as diameters), trophoblast thickness (arithmetic mean) and total and mass-specific morphometric diffusive conductances for oxygen of the intervacular barrier. Two-way analysis of variance showed that both periods of exposure led to significantly smaller fetal weights. Pre-gestational exposure to non-filtered air led to significant increases in fetal capillary surface area and in total and mass-specific conductances. However, the calibres of maternal blood spaces were reduced. Gestational exposure to non-filtered air was associated with reduced volumes, calibres and surface areas of maternal blood spaces and with greater fetal capillary surfaces and diffusive conductances. The findings indicate that urban air pollution affects placental functional morphology. Fetal weights are compromised despite attempts to improve diffusive transport across the placenta.

INTRODUCTION

The study of birth outcomes is of growing importance in environmental epidemiology and experimentation [1]. Epidemiological reports have indicated that exposure to ambient levels of air pollution, mainly particles, affects fetal development [2-9]. Despite the adoption of different study designs and statistical evaluations, and the presence of confounding variables (e.g. maternal smoking, gestational age and socioeconomic factors), these investigations have suggested that the reported associations are causal. Ambient levels of air pollution, including exposure

to particulate matter, are associated also with low birth weight (LBW), intrauterine growth restriction (IUGR) and prematurity [4, 5, 10-14].

Epidemiological studies conducted in São Paulo, Brazil, have explored the relationship between ambient air pollution and fetal health. They have demonstrated deleterious effects of exposure during the first trimester and in the perinatal period [15, 16] and showed that maternal exposure during the first trimester is associated with reduced birth weights. These studies are supported by experiments on rats and mice which have shown that urban air pollution in São Paulo affects respiratory, cardiovascular and reproductive health [17-20]. Using exposure chambers with filtered and non-filtered air, even moderate levels of ambient air pollution were found to compromise the reproductive health of mice [21, 22]. However, little is known about whether or not the effects of environmental air pollution on fetal weight are accompanied by differences in the microscopical structure of the placenta.

Stereological studies on human and animal pregnancies have shown that fetal growth is accompanied by changes in functional morphology of the placenta [23-28]. Human pregnancies complicated by pre-eclampsia, IUGR, maternal residence at high altitude, cigarette smoking, anaemia, diabetes mellitus or asthma also affect fetal weight and placental morphology [29-36] and experimental studies on mice and rats have shown that fetal weight and placental microstructure are influenced by maternal protein and iron restriction [37-39]. In many of these studies, the effects on the placenta involve changes in the maternal and/or fetoplacental vasculatures [25, 28, 39-42].

We hypothesized that alterations in the functional morphology of the placenta could at least contribute to the reduced fetal weights associated with exposure to air pollution. Therefore, the present aim was to investigate the effects of long-term exposure to ambient levels of air pollution in São Paulo on the morphology of the murine placenta and a measure of its capacity for transport by passive diffusion. In order to assess whether there are

critical time windows of exposure, we also sought to identify the main and interaction effects of two exposure periods (before pregnancy and during gestation).

MATERIALS AND METHODS

Experiments were performed downtown in the garden of the University of Sao Paulo School of Medicine which is situated close to a crossroads with high traffic density. Air pollution at this site is mainly vehicular with almost 67% of PM_{2.5} (particulate matter ≤ 2.5 μm in aerodynamic diameter) arising from this source. On the main street of this intersection, about 83,900 cars, 9,900 diesel vehicles and 6,300 motorcycles circulate daily. On the intersecting street, the corresponding figures are 25,600 cars, 5,300 diesel vehicles and 800 motorcycles [43]. Experiments were conducted during June to September 2006 and in accordance with National and Institutional Guidelines for Animal Welfare. They were also approved by the School of Medicine Review Board for Human and Experimental Studies. All animals (inbred Balb C mice) were treated humanely with due consideration being given to the alleviation of distress and discomfort.

Animals

We examined four groups (n=10 mice per group) of second-generation (G2) animals that mated inside exposure chambers containing filtered (F) or non-filtered (nF) air. Group F-F comprised mice that were raised and completed pregnancies in an air-filtered exposure chamber. Group F-nF mice were also raised in an air-filtered chamber but completed pregnancies in a non-filtered chamber. Group nF-nF mice were raised and completed pregnancies in a non-filtered chamber whilst group nF-F mice were raised in a non-filtered chamber and completed pregnancies in an air-filtered chamber.

First generation (G1) mice were obtained by mating animals from the School of Medicine Animal Facility. To this end, 20-day-old mice (10 male and 10 female) were maintained either in filtered (5 couples) or non-filtered (5 couples) chambers until they attained reproductive age (60 days old). At this stage, individual couples were housed separately and allowed to mate. From their offspring, 10 males and 10 females were maintained in their respective chambers for 21 days. After weaning, these G1 mice also were paired and separated into different cages. On reaching reproductive age, 10 couples (5 couples per chamber) were allowed to mate and produce generation G2. Ten male and 10 female G2 animals per chamber followed the same procedures as described for G1 mice. After mating, the first day of pregnancy was determined by observing a vaginal plug and the presence of spermatozoa in a vaginal smear. Pregnant G2 mice were then divided into the four study groups (F-F, F-nF, nF-F and nF-nF) described above. To obtain the G1 and G2 generation of mice we used the same number of animals in each chamber and followed the same procedure for mating and housing.

At the end of the exposure period, all pregnant females were euthanized on the 18th day of gestation by i.p. injection of sodium pentobarbital (200 mg.kg⁻¹ body weight). The abdominal wall was immediately opened and, after amnionectomy, the uterus was carefully examined and fetuses and placentas were quickly removed and weighed. A randomly-selected placenta from each litter was carefully dissected from the extra-embryonic membranes, immersion-fixed in buffered 4% formalin for 24 hr and transferred to 70% ethanol until further analysis.

Exposure conditions and air analysis

The exposure system was similar to that described earlier [21]. The aim was to create a gradient in levels of particulate matter (PM) by filtering ambient air sampled close to a busy street of traffic. Exposures were performed using two open-top chambers assembled side-by-side in the same location. Both chambers received ambient air at a flow rate of 20 m³.min⁻¹ but, in one, the air was not filtered and, in the other, it was filtered. Inside the chambers, animals were kept at ambient conditions of temperature and humidity.

Each chamber comprised an aluminium cylinder, 2.0 m in diameter and 2.15 m high, covered by a plastic UV film. Air was forced into the chamber via the base of the cylinder, was uniformly distributed within it, and exited through a wide aperture at the top of the cylinder. The system was normobaric and pressure inside the chambers did not exceed 30 mm H₂O. In the filtered chamber, three stages of filters (Purafil, São Paulo, Brazil) were arranged serially. The first stage eliminated large particles (plain and bag filters) while the second and third stages (a model JFL-90 followed by a High Efficiency Particulate Air filter) served to trap finer particles.

The 24-hour concentration of PM_{2.5} was determined gravimetrically [43] using Harvard impactors (Air Diagnostics and Engineering Inc., Harrison, ME, USA) at a flow rate of 10 L.m⁻¹ and equipped with polycarbonate filters. Results were expressed as µg.m⁻³. Concentrations of CO (8-hours mean, non-dispersive infrared method), NO₂ (24-hour mean, chemiluminescence method) and SO₂ (24-hour mean, pulse fluorescence method) were obtained from the monitoring station of the State of São Paulo Environmental Agency (CETESB) which was located just 100 m from the exposure chamber site. Gaseous pollutants were not retained by the filtering system and concentrations of NO₂ and CO were similar in both chambers.

Tissue sampling and stereological analysis

Seven placentas (from different litters) in each group were examined. Fixed placentas were weighed (wet weight, g) and sampled by applying a multistage systematic uniform random (SUR) design [45, 46]. Weights were converted into placental volumes (V_{plac}, cm³) by dividing by tissue density, taken to be 1.05 g.cm⁻³ [35]. Placentas were sectioned into 2 mm slices perpendicular to the chorionic plate (defined as the horizontal reference plane) to generate sets of vertical sections [47]. This sampling protocol has the virtue of randomizing section location and orientation both of which are required in order to estimate interface surface areas together

with tissue volumes [45, 48]. Two sets of SUR vertical slices were obtained per placenta and 2-3 slices were sampled in each set. The first set was embedded in paraffin wax to estimate the volumes of different placental zones. The other set was sectioned orthogonal to the reference plane into 2mm strips. An SUR sample of these strips, randomly rotated about their long (vertical) axes, was embedded in glycolmethacrylate resin (Technovit 7100, Ax-lab, Copenhagen, Denmark) to analyze volumes and surfaces within the placental labyrinth in greater detail. Stereological analyses were performed at the light microscopical level. The aims were to estimate the volumetric composition of the mouse placenta together with the surface areas of maternal blood spaces and fetal capillaries. Other quantities (vessel calibres, arithmetic mean thickness, total oxygen diffusive conductance and mass-specific conductance of the intervacular barrier) were derived secondarily from these primary outcome measures.

Primary quantities (volumes and surfaces)

Paraffin blocks were exhaustively cut into 5 μm sections and roughly 8 sections, evenly spaced, were collected onto glass slides and stained using the standard haematoxylin and eosin method. Selected slides were photographed using a X 2.5 objective lens in order to view each slide entire. Volume fractions of the main placental zones (decidua basalis (Db), chorionic plate (Cp), junctional zone (Jz) and labyrinth (Lab) were estimated by the point counting method [48]. On the specimen scale, the test grid had a point spacing of 0.632 mm and an area of 0.4 mm^2 associated with each test point. Each grid was superimposed on the vertically-oriented sections so as to be random in location. Test grid points falling on each zone, P_{zone} , and on the entire placenta, P_{plac} , were counted and volume fractions (V_V) of zones within placentas were estimated using the following equation:

$$\text{Est } V_V = \Sigma P_{\text{zone}} / \Sigma P_{\text{plac}}$$

where ΣP_{zone} and ΣP_{plac} were summed over all fields and sections from each placenta. Subsequently, the total volume of each zone (V_{zone}) within a placenta was estimated by multiplying its volume fraction (V_V) by the corresponding placental volume (V_{plac}):

$$\text{Est } V_{\text{zone}} = V_V \times V_{\text{plac}}$$

From the resin blocks, a series of about 4 evenly-spaced and vertically-orientated sections (thickness 3 μm) was obtained and stained with 1% toluidine blue. Each section contained samples from 3-4 strips. The total volumes of the main sub-compartment of the Lab (fetal capillaries, trophoblast and maternal blood spaces) were estimated also by the point-counting method (point spacing 54 μm , area per point 2916 μm^2 on the specimen scale). Twelve fields of view randomly sampled within the Lab were photographed using a X 40 objective lens. Again, the total volume of each Lab component within a placenta was obtained indirectly by multiplying the volume fraction by the total Lab volume.

Surface densities of maternal blood spaces and fetal capillaries were obtained using a grid of cycloid arcs superimposed on fields of view so that its vertical axis corresponded with the vertical direction of the tissue samples [26, 47]. Intersections between test arcs and the boundary traces of the surfaces of maternal blood spaces or fetal capillaries were counted and summed over all fields for each placenta. The following equation was used to estimate the density of each surface within Lab volume, S_V :

$$\text{Est } S_V = 2 \times \Sigma I_{\text{surf}} / (l_p \times \Sigma P_{\text{lab}})$$

where ΣI_{surf} is the total number of intercepts between cycloid arcs and the compartment surface, l_p is the length of the test line (42.4 μm on the specimen scale) associated with each point and ΣP_{lab} is the number of points hitting the reference space (in this case, Lab). The absolute surface area (S_{surf}) of each compartment (maternal blood space or fetal capillaries) was obtained by multiplying the surface density by Lab volume:

$$\text{Est } S_{\text{surf}} = S_V \times V_{\text{lab}}.$$

Derived quantities (thicknesses, diameters and diffusive conductances)

An estimate of the arithmetic mean thickness of the intervacular barrier (T_a) was derived from the volume of trophoblast (V_{tro}) and the surface areas of the maternal blood spaces (S_{mbs}) and fetal capillaries (S_{fcap}):

$$\text{Est } T_a = 2 \times V_{\text{tro}} / (S_{\text{mbs}} + S_{\text{fcap}}).$$

This estimator of T_a generates larger values than those obtained from measurements of linear intercepts across the intervacular barrier.

Calibre ‘diameters’ of maternal blood spaces and of fetal capillaries were estimated from the corresponding total volumes and surfaces. For example, on the assumption that the fetal capillaries represent a network of uniform right circular cylinders, the diameter of fetal capillaries (D_{fcap}) is given by the equation:

$$\text{Est } D_{\text{fcap}} = 4 \times V_{\text{fcap}} / S_{\text{fcap}}$$

where V_{fcap} is the total volume and S_{fcap} the total surface area of fetal capillaries.

Even though this model better represents fetal capillaries than maternal blood spaces (which are irregularly-shaped spaces), the resulting diameters are only approximations because they assume vessels/spaces are circular in transverse section and uniform along their length. However, the principal aim here was to understand whether or not changes in vascular volumes might be attended by changes in calibre.

Total oxygen diffusive conductance ($\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$) of the intervacular barrier is determined by a set of structural and physicochemical quantities which characterise the physical dimensions and physiological properties of tissue components interposed between the maternal and fetal vessels [24, 26]. A measure of the diffusive conductance (D_{ivb}) of this membrane can be obtained from estimates of exchange surface areas and harmonic mean thickness (Th_{ivb}) using the relationship:

$$\text{Est } D_{\text{ivb}} = K \cdot (S_{\text{mbs}} + S_{\text{fcap}}) / 2 \cdot Th_{\text{ivb}}$$

where K represents Krogh's diffusion coefficient and for which we adopted the value of $17.3 \times 10^{-8} \text{ cm}^2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$ [24]. The harmonic mean differs from an arithmetic mean by giving greater weight to thinner regions of the intervacular membrane, i.e. to regions across which diffusion will proceed more efficiently. In the present study, we approximated Divb by using the arithmetic (T_a) rather than the harmonic mean barrier thickness. Recent studies on murine placentas [26] have suggested that, when estimated from orthogonal intercept length measurements, the arithmetic mean is roughly 7-10% greater than the harmonic mean after 16.5 days of pregnancy. Mass-specific conductances ($\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$) were established simply by dividing Divb by the weight of the fetus. To monitor tissue processing distortions in different groups of placentas, the mean diameters of red blood cells were used as internal calibration standards. With the ImageJ Program software [<http://rsb.info.nih.gov/ij/>], linear magnifications were calibrated by photographing a micrometer scale as an external standard. The software was used also to generate and superimpose the test grids and perform the measurements [49].

Statistical analyses

All data handling and statistical analyses were performed using SPSS 13 or Unistat v5.5 statistical software. Means and standard errors of means (SEM) were calculated for each group. In order to monitor between-subject variation within groups, we also calculated the observed coefficient of variation ($\text{CV} = \text{standard deviation}/\text{mean}$) for each placental variable. A two-way analysis of variance (2-way ANOVA) was performed to resolve the main effects of maternal pre-gestational exposure and gestational exposure. This test produces an interaction term which identifies whether or not the effects of one factor (pre-gestational exposure) are influenced by the effects of the other (gestational exposure). Null hypotheses were rejected at a probability level of $P < 0.05$.

RESULTS

These are summarised in Tables 1 and 2. Although not shown, the CVs of placental variables, with few exceptions, were greatest in the nF-nF (pre-gestational and gestational exposure to non-filtered air) group (range 15-54% of corresponding group means). Moreover, the differences were most exaggerated for maternal blood space variables and diffusive conductances (35-54%). By contrast, the CVs for placental variables tended to be lowest in the F-F (both exposures to filtered air) group (range 7-24%).

Pollution indices

Mean ambient levels of NO_2 , CO and SO_2 were $101 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ ($\text{CV} = 43\%$), $1.81 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ ($\text{CV} = 50\%$) and 7.66 ppm ($\text{CV} = 64\%$) respectively. During the exposure period, four samples per week were taken to measure the concentrations of $\text{PM}_{2.5}$ in the F and nF chambers and in the local environment. The mean concentration of $\text{PM}_{2.5}$ in the nF groups was $27.5 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$ ($\text{CV} = 44\%$) and values overall were similar to those measured in the local

environment. However, the mean value ($6.5 \mu\text{g.m}^{-3}$; CV = 49%) was significantly lower in the filtered chambers ($P < 0.001$).

Litter sizes and birthweights

In group F-F (pre-gestational and gestational rearing in filtered chambers), average litter weight was 6.41 g, the number of pups per litter was 7.4 and average fetal weight was 0.905 g (Table 1). Fetal weight was influenced by both pre-gestational ($P < 0.05$) and gestational ($P < 0.01$) periods of exposure but litter size did not vary significantly between groups. Although total litter weight appeared to decline in groups exposed to non-filtered polluted air, the apparent effects overall were not significant. However, post-hoc testing (not shown) indicated a significant difference in total litter weights between groups F-F and nF-nF ($P < 0.05$).

Placental tissue volume

There were no significant main or interaction effects involving total placental volume or the volumes of its Db, Jz or Lab (Table 1). However, there was a significant interaction effect on chorionic plate volume. Further analysis of Lab sub-compartments, showed that the maternal blood space volume was reduced in groups exposed to non-filtered air during pregnancy ($P < 0.001$). The differences were between 22% (comparing F-F and F-nF groups) and 37% (nF-F and nF-nF groups). Apparent differences in the volumes of fetal capillaries and trophoblast were not significant.

Exchange surface areas and vessel/blood space diameters

In group F-F, the exchange surface areas for the maternal blood space and fetal capillaries were 19.1 cm^2 and 17.1 cm^2 respectively (Table 2). Maternal blood space surfaces were 11-13% less extensive in groups completing pregnancies in non-filtered air ($P < 0.05$). By contrast, fetal capillary surfaces were greater in these groups ($P < 0.01$) and also in gestational groups exposed to non-filtered air ($P < 0.05$). As a consequence of these changes, there was a significant gestational effect on maternal: fetal surface ratios with values declining significantly (by 20-40%) in groups exposed during pregnancy to non-filtered air ($P < 0.001$). The differences in vascular volumes and surfaces were accompanied by changes in the mean diameters of maternal blood spaces but not those of fetal vessels (Table 2). In the F-F group, maternal blood spaces had an apparent mean diameter of $33 \mu\text{m}$ with significant main effects of pre-gestational and gestational exposures ($P < 0.01$ in both cases). During both periods, maternal blood spaces calibres declined.

Thickness of the intervacular barrier

In placentas from group F-F, the arithmetic mean thickness of the intervacular barrier was about $14 \mu\text{m}$ (Table 2) but the apparent decline in the other groups failed to reach significance and there was no significant interaction effect.

Oxygen diffusive conductances

The total oxygen diffusive conductance of the intervacular barrier amounted to $0.0022 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$ (Table 2) in group F-F placentas and this value increased significantly during pre-gestational exposure to non-filtered air ($P < 0.05$). Apparent increases during gestational exposures were not significant and no interaction effects were detected.

When normalised for differences in fetal weights, the mass-specific conductance in the F-F group amounted to $0.0026 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$ (Table 2). This value increased during pre-gestational and gestational periods of exposure to non-filtered air ($P < 0.01$ in both cases)

DISCUSSION

The hypothesis underlying the present study was that the effects of particulate urban air pollution on murine pregnancies would result in changes in functional morphology of the placenta. As far as we are aware, this is the first study to characterize placental morphometric changes secondary to maternal exposure to particulate air pollution. In fact, decreases in fetal weight were accompanied by decreases in the volume of the maternal blood space, the mean calibre of maternal blood spaces and the maternal:fetal surface ratio and to increases in the surface area of fetal capillaries, the total diffusive conductance of the intervacular barrier and the mass-specific conductance of that barrier. Both pre-pregnancy and pregnancy periods of exposure to non-filtered air resulted in morphological changes in the placenta but the gestational period was associated with the more dramatic changes. However, pre-gestational exposure did reduce maternal blood space diameters suggesting that maternal vascular changes might result from systemic changes or a compromised uterine environment prior to pregnancy. Despite the maternal vascular differences, changes in fetal capillary surface areas during gestational exposure helped to increase total and mass-specific diffusive conductances of the intervacular barrier. The accompanying coefficients of variation indicated that most placental variables varied less (7-24%) in groups exposed to filtered air during both the pre-gestational and gestational periods. Conversely, most placental variables varied more (15-54%) in the group exposed to non-filtered air during both periods. The greater inter-individual variation within a group may be an indicator of poorer adaptability to the polluted environment. In contrast, the coefficient of variation for fetal weight was greater in the F-F group (22%) and this is, perhaps, indicative of the fact that these conditions impose less environmental stress.

Present estimates of placental quantities can be compared with those obtained in other studies on murine placentas [26, 27, 39]. Agreement is best for compartment volumes, vascular surfaces and maternal: fetal surface ratios and the discrepancies are probably attributable to strain differences. However, larger discrepancies exist between present and previous estimates of arithmetic mean thickness, vessel calibres and diffusive conductances. It is likely that these are further influenced by differences in methods of estimation but it is

important to appreciate that, in the present context, they still allow valid internal comparisons to be drawn between the different experimental groups. A possible exception is the comparison of conductances, results for which should be regarded as tentative owing to the substitution of arithmetic thicknesses in diffusion equations.

Our estimate of arithmetic thickness of the intervacular barrier in group F-F (14.3 μm) was obtained by relating trophoblast volume to the combined surfaces of maternal blood spaces and fetal capillaries. The value is greater than the estimate of 4.8 μm obtained by measuring orthogonal intercept lengths from randomly-selected sites on the barrier surface [26]. The discrepancy is probably explained by local surface curvature effects and by differences in amounts of intervacular tissue featuring in the different approaches. This is supported by the fact the volume and surface data in Coan et al [26] yield an arithmetic thickness of 14.5 μm , a value essentially identical to ours. These differences in arithmetic mean thickness of the intervacular barrier account in part for the apparent inconsistency with earlier estimates of total and mass-specific conductances [26]. However, an additional factor is that such estimates are best based on harmonic rather than arithmetic means because the former accord appropriate weight to thinner areas of the barrier across which passive diffusion will occur more efficiently. It has been demonstrated that the harmonic mean thickness of the barrier is roughly 9% smaller than the arithmetic mean in mice at 18.5 days of gestation [26]. With these corrections, our estimate of total conductance more closely approximates the earlier estimate [26].

Differences in vessel diameters are also explicable in terms of variations in methods of calculation. Previous estimates obtained by dividing vessel volumes by lengths have yielded values of 11-16 μm for maternal blood spaces and 8-15 μm for fetal capillaries [26, 28, 39]. This method produces lower and less biased estimates than those obtained by dividing volumes by surface areas as illustrated by the fact that such data in Coan et al [26] produce an estimate of capillary diameter of 20.6 μm and this value is much closer to our estimate of 18.7 μm for placentas in group F-F.

Epidemiological studies conducted in São Paulo and elsewhere have demonstrated associations between maternal exposure to particulate matter in polluted air and adverse effects on fetal development including low birth weight [2, 15, 16, 21, 22, 50]. Here, we observed that exposure to air pollution before and during gestation had no significant affect on litter size although mean fetal weights were significantly smaller in mice reared before and/or during pregnancy in non-filtered exposure chambers. In mammals, most embryonic losses occur during early pregnancy, a critical period in which major developmental events occur including formation of the placenta and organogenesis. Placental development involves extensive angiogenesis in uteroplacental and fetoplacental vasculatures as well as increases in uterine and umbilical blood flows [41, 51]. Thus, factors that affect vascular development and function will have impacts on fetal growth, development and survival [52, 53].

The spectrum of changes seen in pregnancies associated with non-filtered ambient air is somewhat surprising in the sense that some seem to be adaptive and others deleterious. Thus, the greater surface area of fetal capillaries, total diffusive conductance and mass-specific conductance of the intervacular barrier may be seen as fetoplacental adaptations serving to maintain and expand oxygen and nutrient delivery to the growing fetal mass. These variables increased significantly as a result of maternal pre-gestational and gestational exposure. The fact that fetal weight declines despite these adaptations implies that other factors exert influential effects. Amongst these must be considered the effects of smaller maternal blood space volumes and calibres on the maternal side of the placenta. In mice, the maternal blood space develops and attains its maximum volume between 14.5 and 16.5 days of gestation and, consequently, this may represent the period of maximal perfusion on the maternal side. In contrast, fetal capillaries grow slowly between 12.5 and 14.5 days but, thereafter, their volume and surface area expand until 18.5 days of gestation [26-28]. The changes reported here suggest compromised delivery of maternal blood to the placenta and an increase in resistance to its flow. Indeed, fine particulate matter, PM_{2.5}, has been shown to produce significant vasoconstriction in healthy rats, albeit in the small arteries of the heart and lungs [54]. Other things being equal, the expected increase in vascular resistance due to the reduced calibre of maternal blood spaces in the placenta could be overcome by increasing the branching complexity of maternal blood spaces, comparable to the enhanced branching angiogenesis seen in human fetoplacental capillaries [55]. Future studies are required in order to test whether or not this occurs in the present model.

Within polluted air, particulate matter, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), bisphenol-A and heavy metals have the potential to harm fetal or placental development. Analyses of emission samples generated by fossil fuel combustion have detected many aromatic carbonyls, large-molecule alcohols, PAHs and derivatives, and substituted phenolic compounds and derivatives which may act as environmental oestrogens [56]. Pregnant women living in highly-polluted industrial regions also present with high lead concentrations and more PAH-DNA adducts in umbilical cord blood [57, 58]. Taken together, these studies suggest the possibility of transplacental transfer of pollutants from mother to fetus.

Among the pollutants present in urban air is CO which is known to cause fetal hypoxia by forming carboxyhaemoglobin at the expense of oxyhaemoglobin. The mechanisms by which other pollutants, including particulates, influence perinatal outcomes are not uniformly clear but possible mechanisms include induction of apoptosis following DNA damage, induction of p450 enzymes, binding to growth factors and endocrine disruption. In this study, we have shown that maternal aspects of placental development are affected and so this could represent one of the factors involved in impaired fetal development. However, the study design did not allow us to identify which components present in the air were responsible for the changes or if any pollutants

crossed the maternal-fetal barrier. More detailed chemical analyses of particulate matter composition are required in order to identify specific constituents.

Amongst other factors via which air pollution might influence birth outcomes are systemic alterations in haematocrit, blood viscosity, blood coagulability, endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation [54, 59-65]. Increases in such factors, exacerbating the effects of decreases in vessel calibres, might be expected to have marked effects on maternal blood rheology.

In conclusion, this study has demonstrated that ambient levels of particulate matter and other pollutants generated by urban traffic may impair the reproductive and fetal health of mice by affecting the maternal side of the placental interface between the mother and fetus. Despite parallel attempts on the fetal side to improve transport by passive diffusion, fetal weights are reduced.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Ana J. Lichtenfels, Regiani C. de Oliveira and Dr. Paulo Panse Silveira for PM_{2.5} monitoring and the chamber schematic for Figure 1

REFERENCES

1. Šrám RJ, Binková B, Dejmek J, Bobak M. Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature *Environ Health Perspect* 2005;113(4):375-382.
2. Wang X, Ding H, Ryan L, Xu X. Association between air pollution and low birth weight: a community-based study. *Environ Health Perspect* 1997;105(5):514-520.
3. Bobak M, Leon DA. Pregnancy outcomes and outdoor air pollution: an ecological study in districts of the Czech Republic 1986-88. *Occup Environ Med* 1999;56:539-543.
4. Djemek J, Selevan SG, Benes I, Solanský I, Šrám RJ. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. *Environ Health Perspect* 1999;107:475-480.
5. Dejmek J, Solanský I, Benes I, Leníček J, Šrám RJ. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. *Environ Health Perspect* 2000; 108:1159-1164.
6. Ha EH, Hong YC, Lee BE, Woo BH, Schwartz J, Christiani DC. Is air pollution a risk factor for low birth weight in Seoul? *Epidemiology* 2001;12:643-648.
7. Lee BE, Ha EH, Park HS, Kim YJ, Hong YC, Kim H, Lee JT. Exposure to air pollution during different gestational phases contributes to risks of low birth weight. *Hum Reprod* 2003;18:638-643.
8. Mohorovic L. First two months of pregnancy - critical time for preterm delivery and low birthweight caused by adverse effects of coal combustion toxics. *Early Hum Dev* 2004; 80(2):115-123.
9. Ritz B, Wilhelm M, Hoggatt KJ, Ghosh JK. Ambient air pollution and preterm birth in the environment and pregnancy outcomes study at the University of California, Los Angeles. *Am J Epidemiol* 2007;166(9):1045-1052.
10. Xu X, Ding H, Wang X. Acute effects of total suspended particles and sulfur dioxides on preterm delivery: a community-based cohort study. *Arch Environ Health* 1995;50:407-415.
11. Bobak M. Outdoor air pollution, low birth weight, and prematurity. *Environ Health Perspect* 2000;108:173-176.
12. Ritz B, Yu F, Chapa G, Fruin S. Effect of air pollution on preterm birth among children born in Southern California between 1989 and 1993. *Epidemiology* 2000;11:502-511.
13. Maisonet M, Bush TJ, Correa A, Jaakkola JJ. Relation between ambient air pollution and low birth weight in the Northeastern United States. *Environ Health Perspect* 2001;109, Suppl 3: 351-356.
14. Parker JD, Woodruff TJ, Basu R, Schoendorf KC. Air pollution and birth weight among term infants in California. *Pediatrics* 2005;115:121-128.
15. Pereira LA, Loomis D, Conceição GM, Braga AL, Arcas RM, Kishi HS, Singer JM, Böhm GM, Saldiva PH. Association between air pollution and intrauterine mortality in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect* 1998;106(6):325-329.
16. Gouveia N, Bremner SA, Novaes HM. Association between ambient air pollution and birth weight in São Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health* 2004;58:11-17.
17. Böhm GM, Saldiva PH, Pasqualucci CA, Massad E, Martins ME, Zin WA, Cardoso WV, Criado PM, Komatsuzaki M, Sakae RS, et al. Biological effects of air pollution in São Paulo and Cubatão. *Environ*

- Res 1989;49:208-216.
18. Saldiva PH, King M, Delmonte VL, Macchione M, Parada MA, Daliberto ML, Sakae RS, Criado PM, Silveira PL, Zin WA, et al. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ Res* 1992;57:19-33.
 19. Lemos M, Lichtenfels AJ, Amaro JE, Macchione M, Martins MA, King M, Böhm GM, Saldiva PH. Quantitative pathology of nasal passages in rats exposed to urban levels of air pollution. *Environ Res* 1994;66:87-95.
 20. Pereira P, Saldiva PH, Sakae RS, Böhm GM, Martins MA. Urban levels of air pollution increase lung responsiveness in rats. *Environ Res* 1995;69:96-101.
 21. Mohallem SV, de Araujo Lobo DJ, Pesquero CR, Assunção JV, de Andre PA, Saldiva PH, Dolnikoff M. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of São Paulo. *Environ Res* 2005;98:196-202.
 22. Lichtenfels AJ, Gomes JB, Pieri PC, El Khouri Miraglia SG, Hallak J, Saldiva PH. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil *Fertil Steril* 2007;87(1):230-232.
 23. Jackson MR, Mayhew TM, Boyd PA. Quantitative description of the elaboration and maturation of villi from 10 weeks of gestation to term. *Placenta* 1992;13:357-370.
 24. Mayhew TM, Jackson MR, Boyd PA. Changes in oxygen diffusive conductances of human placentae during gestation (10-41 weeks) are commensurate with the gain in fetal weight. *Placenta* 1993;14:51-61.
 25. Mayhew TM. Fetoplacental angiogenesis during gestation is biphasic, longitudinal and occurs by proliferation and remodelling of vascular endothelial cells. *Placenta* 2002; 23:742-750.
 26. Coan PM, Ferguson-Smith AC, Burton GJ. Developmental dynamics of the definitive mouse placenta assessed by stereology. *Biol Reprod* 2004;70:1806-1813.
 27. Watson ED, Cross JC. Development of structures and transport functions of the mouse placenta. *Physiology* 2005;20:180-193.
 28. Rutland CS, Mukhopadhyay M, Underwood S, Clyde N, Mayhew TM, Mitchell CA. Induction of intrauterine growth restriction by reducing placental vascular growth with the angioinhibin TNP470. *Biol Reprod* 2005;73:1164-1173.
 29. Teasdale F. Histomorphometry of the human placenta in pre-eclampsia associated with severe intrauterine growth retardation. *Placenta* 1987;8:119-128.
 30. Jackson MR, Mayhew TM, Haas JD. On the factors which contribute to thinning of the villous membrane in human placentae at high altitude. I. Thinning and regional variation in thickness of trophoblast. *Placenta* 1988;9:1-8.
 31. Mayhew TM, Jackson MR, Haas JD. Oxygen diffusive conductances of human placentae from term pregnancies at low and high altitudes. *Placenta* 1990;11:493-503.
 32. Mayhew TM, Sørensen FB, Klebe JG, Jackson MR. Oxygen diffusive conductance in placentae from control and diabetic women. *Diabetologia* 1993;36(10):955-960.
 33. Reshetnikova OS, Burton GJ, Teleshova OV. Placental histomorphometry and morphometric diffusing capacity of the villous membrane in pregnancies complicated by maternal iron-deficiency anemia. *Am J Obstet Gynecol* 1995;173(3):724-727.
 34. ush PG, Mayhew TM, Abramovich DR, Aggett PJ, Burke MD, Page KR. Maternal cigarette smoking and oxygen diffusion across the placenta. *Placenta* 2000;21(8):824-833.
 35. Mayhew TM, Ohadike C, Baker PN, Crocker IP, Mitchell C, Ong SS. Stereological investigation of placental morphology in pregnancies complicated by pre-eclampsia with and without intrauterine growth restriction. *Placenta* 2003;24:219-226.
 36. Mayhew TM, Jenkins H, Todd B, Clifton VL. Maternal asthma and placental morphometry: effects of severity, treatment and fetal sex. *Placenta* 2008;29(4):366-373.
 37. Lewis RM, Doherty CB, James LA, Burton GJ, Hales CN. Effects of maternal iron restriction on placental vascularisation in the rat. *Placenta* 2001;22:534-539.
 38. Doherty CB, Lewis RM, Sharkey A, Burton GJ. Placental composition and surface area but not vascularisation is altered by maternal protein restriction in the rat. *Placenta* 2003;24:34-38.
 39. Rutland CS, Latunde-Dada AO, Thorpe A, Plant R, Langley-Evans S, Leach L. Effect of gestational nutrition on vascular integrity in the murine placenta. *Placenta* 2007;28:734-742.
 40. Mayhew TM. Enhanced fetoplacental angiogenesis in pre-gestational diabetes mellitus: the extra growth is exclusively longitudinal and not accompanied by microvascular remodelling. *Diabetologia* 2002;45:1434-1439.
 41. Kaufmann P, Mayhew TM, Charnock-Jones DS. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. II. Changes during normal pregnancy. *Placenta* 2004; 25:114-126.
 42. Mayhew TM, Charnock-Jones DS, Kaufmann P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta* 2004; 25:127-139.
 43. Characterization of the air quality monitoring station near the exposure region was retrieved from CETESB 2005 Technical Report (URL:<http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/relatorios.asp>)-downloaded on January, 2008.

44. Chow JC. Measurement methods to determine compliance with ambient air quality standards for suspended particles. *J Air Waste Manag Assoc* 1995;45(5):320-382.
45. Mayhew TM. Stereology and the placenta: where's the point? – a review. *Placenta* 27 (Suppl A), *Troph Res* 2006;27:S17-S25.
46. Mayhew TM. Taking tissue samples from the placenta: an illustration of principles and strategies. *Placenta* 2008;29:1-14.
47. Baddeley AJ, Gundersen HJ, Cruz-Orive LM. Estimation of surface area from vertical sections. *J Microsc* 1986;142:259-276.
48. Howard CV, Reed MG. Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy. 2nd ed. Abingdon, Oxon: Garland Science/Bios Scientific; 2005:103-117.
49. Papadopoulos F, Spinelli M, Valente S, Foroni L, Orrico C, Alviano F, Pasquinelli G. Common tasks in microscopic and ultrastructural image analysis using ImageJ. *Ultrastruct Pathol* 2007;31(6):401-407.
50. Huynh M, Woodruff TJ, Parker JD, Schoendorf KC. Relationships between air pollution and preterm birth in California. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2006;20:454-461.
51. Reynolds LP, Redmer DA. Utero-placental vascular development and placental function. *J Anim Sci* 1995;73:1839-1851.
52. Kingdom J, Huppertz B, Seaward G, Kaufmann P. Development of the placental villous tree and its consequences for fetal growth. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000; 92:35-43.
53. Sherer DM, Abulafia O. Angiogenesis during implantation, and placental and early embryonic development. *Placenta* 2001;22: 1-13.
54. Rivero DH, Soares SR, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, Dolhnikoff M, Saldiva PH. Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of São Paulo, Brazil. *Toxicol Sci* 2005;85:898-905.
55. Charnock-Jones DS, Kaufmann P, Mayhew TM. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis. I. Molecular regulation. *Placenta* 2004;25:103-113.
56. Miller KP, Borgeest C, Greenfeld C, Tomic D, Flaws JA. In utero effects of chemicals on reproductive tissues in females. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004;198:111-31.
57. Sharara FI, Seifer DB, Flaws JA. Environmental toxicants and female reproduction. *Fertil Steril* 1998;70:613-622.
58. Perera FP, Jedrychowski W, Rauh V, Whyatt RM. Molecular epidemiologic research on the effects of environmental pollutants on the fetus. *Environ Health Perspect* 1999;107, Suppl 3:451-460.
59. Baskurt OK, Levi E, Caglayan S, Dikmenoglu N, Kutman MN. Hematological and hemorheological effects of air pollution. *Arch Environ Health* 1990;45:224-228.
60. Knottnerus JA, Delgado LR, Knipschild PG, Essed GG, Smits F. Haematologic parameters and pregnancy outcome. A prospective cohort study in the third trimester. *J Clin Epidemiol* 1990;43:461-466.
61. Peters A, Döring A, Wichmann HE, Koenig W. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet* 1997;349:1582-1587.
62. Pekkanen J, Brunner EJ, Anderson HR, Tiittanen P, Atkinson RW. Daily concentrations of air pollution and plasma fibrinogen in London. *Occup Environ Med* 2000;57:818-822.
63. Sørensen M, Daneshvar B, Hansen M, Dragsted LO, Hertel O, Knudsen L, Loft S. Personal PM_{2.5} exposure and markers of oxidative stress in blood. *Environ Health Perspect* 2003;111:161-166.
64. Delfino RJ, Sioutas C, Malik S. Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ Health Perspect* 2005; 113:934-946.
65. Risom L, Møller P, Loft S. Oxidative stress induced DNA damage by particulate air pollution. *Mutat Res* 2005;592:119-137.

Figure Legends

Figure 1. Diagrammatic representation of the exposure chambers and the flow of filtered or non-filtered air within them (arrows).

Figure 2. Histological appearance of the labyrinthine compartment of the murine placenta in the filtered (A) and non-filtered (B) groups. Note the smaller calibre of maternal blood spaces (white arrow) in the non-filtered group; fetal capillaries (black arrow head). Toluidine blue. Scale bar: 25 μ m.

Table 1. The effects of exposure period (pre-gestational and gestational) on litter size, fetal weight (g) and placental volumes (mm^3). Values are group means (SEM) for n=7 mice.

Variable	Group F-F	Group F-nF	Group nF-F	Group nF-nF
Litter weight	6.41 (0.65)	4.92 (0.43)	4.66 (0.74)	4.37 (0.64)
Pups/litter	7.4 (1.02)	7.1 (0.7)	6.4 (1.0)	6.4 (0.75)
^{a,b} Fetal weight	0.905 (0.076)	0.694 (0.019)	0.722 (0.026)	0.664 (0.047)
Placenta volume	97.0 (4.9)	90.4 (6.0)	83.8 (4.7)	96.2 (6.5)
Decidua volume	17.5 (3.3)	18.9 (4.1)	15.2 (1.8)	21.5 (4.5)
Junctional zone Volume	20.4 (0.9)	20.9 (1.5)	16.2 (1.2)	20.2 (1.6)
^c Chorionic plate volume	9.5 (0.9)	8.2 (1.1)	6.3 (0.8)	11.2 (1.4)
Labyrinthine volume	49.6 (2.1)	42.4 (1.8)	46.1 (2.7)	43.3 (3.6)
Trophoblast volume	25.9 (1.6)	22.5 (1.8)	23.6 (1.8)	24.4 (1.6)
^b Maternal blood volume	15.6 (0.7)	12.2 (0.04)	14.7 (0.8)	9.2 (1.9)
Fetal capillary volume	8.0 (0.8)	7.7 (0.6)	7.7 (0.8)	9.6 (1.1)

^asignificant effect of pre-gestational exposure; ^bsignificant effect of gestational exposure; ^csignificant interaction effect.

Table 2. The effects of exposure period (pre-gestational and gestational) on exchange surface areas (cm^2), vessel/blood space calibres (μm), arithmetic barrier thicknesses (μm) and total and mass-specific diffusive conductances ($\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1}$ and $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kPa}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$). Values are group means (SEM) for $n=7$ mice.

Variable	Group F-F	Group F-nF	Group nF-F	Group nF-nF
^b Maternal blood surface	19.1 (0.84)	16.6 (0.78)	19.9 (1.14)	17.8 (1.04)
^{a,b} Fetal capillary surface	17.1 (0.46)	18.8 (1.06)	17.8 (2.00)	25.5 (1.93)
^b Surface ratio	1.12 (0.04)	0.89 (0.04)	1.19 (0.13)	0.71 (0.05)
^{a,b} Maternal blood space diameter	32.9 (1.55)	29.9 (1.78)	29.6 (0.95)	20.1 (3.36)
Fetal capillary diameter	18.7 (1.84)	16.6 (1.27)	17.5 (0.84)	15.3 (1.70)
Trophoblast thickness	14.3 (0.65)	12.7 (0.68)	12.7 (1.02)	11.6 (1.14)
^a Total conductance	0.0022 (0.0001)	0.0025 (0.0001)	0.0027 (0.0003)	0.0035 (0.0005)
^{a,b} Specific conductance	0.0026 (0.0003)	0.0035 (0.0002)	0.0037 (0.0004)	0.0054 (0.0007)

^asignificant effect of pre-gestational exposure; ^bsignificant effect of gestational exposure.

Figure 1

Figure 2

Apêndice II- Trabalho submetido à publicação

Chronic Exposure to Fine Particulate Matter Emitted by Traffic Affects Reproductive and Fetal Outcomes in Mice

*Mariana Matera Veras^{1,2}, Nilsa Regina Damaceno-Rodrigues², Rosane Maria Guimarães Silva², Julia Nogueira Scoriza¹, Paulo H. Nascimento Saldiva¹, Elia Garcia Caldini² and Marisa Dolhnikoff¹

Submitted to Environmental Research, Jul 2008.

Title:

Chronic Exposure to Fine Particulate Matter Emitted by Traffic Affects Reproductive and Fetal Outcomes in Mice

Running title: Air pollution and reproductive outcomes

Authors:

*Mariana Matera Veras^{1,2}, Nilsa Regina Damaceno-Rodrigues², Rosane Maria Guimarães Silva², Julia Nogueira Scoriza¹, Paulo H. Nascimento Saldiva¹, Elia Garcia Caldini² and Marisa Dolhnikoff¹

(1)Laboratory of Experimental Air Pollution (LIM05), Department of Pathology, School of Medicine, University of São Paulo, Avenida Doutor Arnaldo, 455, sala 1155, Cerqueira Cesar, Zip Code 01246-903, São Paulo, Brazil.

(2)Laboratory of Cell Biology (LIM59), Department of Pathology, School of Medicine, University of São Paulo, Avenida Doutor Arnaldo, 455, sala 4309, Cerqueira Cesar, Zip Code 01246-903, São Paulo, Brazil.

***Corresponding author:** Mariana Matera Veras, PhD, Dept of Pathology, Laboratory of Experimental Air Pollution (LIM 05), University of São Paulo, School of Medicine, Avenida Doutor Arnaldo, 455, room 1155, Cerqueira Cesar, Zip Code: 01246-903, São Paulo, Brazil.

Email: verasine@usp.br; Phone: + 55-11 30617377 Fax: + 55-11- 30628098

Grant support:

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 05/548573 and # 03/107729), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and by Laboratório de Investigações Médicas LIM05 and LIM59 HC-FMUSP.

Key words: air pollution, reproductive outcome, pregnancy outcomes, estrous cycle, ovarian follicles counts.

The authors ensure that the experiments were conducted in accordance with the National and Institutional Guidelines for Animal Welfare. They were also approved by the School of Medicine Review Board for Human and Experimental Studies. All animals (BalbC mice) were treated humanely with due consideration being given to the alleviation of distress and discomfort.

Abstract:

Air pollution is an important environmental health risk factor that can result in many different gestational and reproductive negative outcomes. In this study, we have investigated the effects of two different times of exposure (before conception and during pregnancy) to urban ambient particulate matter on reproductive and pregnancy outcomes in mice. Using exposure chambers receiving filtered (F) and non-filtered (NF) air, we observed that exposed females exhibited changes in the length of estrus cycle and extended estrus and, therefore, a reduction in the number of cycles during the studied period ($F = 2.6 \pm 0.22$ and $NF = 1.2 \pm 0.29$, $p = 0.03$). Mean number of antral follicles declined by 36% ($p = 0.04$) in NF mice (75 ± 35.2) compared to F mice (118.6 ± 18.4). Our results further indicate a significant increase in time necessary to mating and decreased fertility and pregnancy indices ($p = 0.003$) in NF couples. Mean post-implantation loss rates were increased by 70% ($P \leq 0.005$) in the NF2 group (exposed before and during pregnancy to non-filtered air) compared to the F1 group (exposed before and during pregnancy to filtered air) and were influenced by both pre-gestational ($p < 0.004$) and gestational ($p < 0.01$) period exposure. Fetal weight was significantly higher in the F1 group when compared to the other groups ($p < 0.001$), at a 20% higher weight in the F1 group ($0.86 \pm 0.18g$) than in the NF2 group ($0.68 \pm 0.10g$). Furthermore, fetal weight was influenced by both pre-gestational and gestational period exposure, and there was found to be a significant interaction between these two factors ($p < 0.001$). This study demonstrated that exposure to ambient levels of urban traffic generated particulate matter negatively affects different functions and stages of the reproductive process. Our results also reinforce the idea that maternal exposure to air pollution is linked to negative pregnancy outcomes, even if the exposure occurs only before conception.

Introduction

Ambient air pollution is an important environmental risk factor for many different diseases. Numerous epidemiological studies report significant associations between air pollution exposure, mainly particulate matter (PM), and adverse health effects (WHO, 2003; 2005). Epidemiological studies have also shown that air pollution may affect reproductive health, such as decreasing male fertility (Rubens et al, 2005), altering sperm quality (Selevan et al., 2000; Djemek et al., 2000a), increasing the risk for low birth weight (Djemek et al., 2000b; Maisonet, 2001; Gouveia et al., 2004), retarding intrauterine growth (Djemek et al., 1999; 2000c) and resulting in prematurity (Xu et al., 1995; Ritz et al., 2000; Bobak, 2000). Evidence about the adverse effects of air pollution on fetal development (Wang et al., 1997; Perera et al, 1999; Bobak and Leon, 1999; Djemek et al., 2000c; Rogers and Dunlop, 2000; Ha et al., 2001; Lee et al., 2003; Mohorovic, 2004; Sram et al., 2005; Wang et al, 2007; Ritz et al., 2007) is sufficient to support the conclusion that the reported associations are causal and not fallacious, despite the presence of several confounding variables (i.e., maternal smoking, gestational age and socioeconomic factors) as well as the different designs and statistical approaches among studies.

In addition to epidemiological data, experimental studies have also shown that air pollution affects reproductive health. We have previously reported that urban air pollution, even at moderate levels, may have deleterious effects on mouse reproductive health, such as a decrease in the number of viable fetuses, a higher number of implantation failures (Mohallem et al., 2005), a decrease in male/female ratio (Lichtenfels et al 2007) and changes in functional morphology of the placenta (Veras et al 2008).

Although the association of air pollution with impairment of reproductive health and adverse fetal outcomes is increasingly recognized, most of the studies until now have focused on the exposure during the gestational period. Hitherto, the effects of pre-gestation exposure have not been explored. The possibility that maternal exposure to different environmental contaminants, even before pregnancy, may affect reproduction has already been recognized in the occupational epidemiology literature (Knight and Marrett, 1997; Shaw and Gold, 1988; O'Halloran and Spickett, 1992; Silbergeld and Patrick 2005). Therefore, the purpose of the present study was to evaluate the effects of maternal exposure, both before and during pregnancy, to ambient levels of particulate air pollution on reproductive functions in female mice by assessing estrous cyclicity and ovarian follicle numbers as well as pregnancy and couple-mediated reproductive outcomes.

Material and Methods

Experiments were conducted in accordance with the National and Institutional Guidelines for Animal Welfare. They were also approved by the School of Medicine Review Board for Human and Experimental Studies. All animals (BalbC mice, inbred) were treated humanely with due consideration being given to the alleviation of distress and discomfort.

Site of exposure

Experiments were performed in the garden of the University of Sao Paulo School of Medicine, which is situated close to a crossroads with high traffic density. Air pollution at this site is mainly vehicular, with almost 67% of PM_{2.5} (particulate matter $\leq$ 2.5 μ m in aerodynamic diameter) emitted from this source. On the main street of this intersection, approximately 83,900 cars, 9,900 diesel vehicles and 6,300 motorcycles circulate daily. On the intersecting street, the corresponding figures are 25,600 cars, 5,300 diesel vehicles and 800 motorcycles (CETESB, 2006).

Exposure conditions and air analysis

The exposure system was similar to that described earlier (Mohallem et al., 2005), with the aim of creating a gradient in levels of particulate matter (PM) by filtering ambient air sampled close to a busy street of traffic. Exposures were performed using two open-top chambers assembled side-by-side in the same location. Both chambers received ambient air at a flow rate of $20 \text{ m}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, but the air was filtered in one chamber and not in the other. Inside the chambers, animals were kept at ambient conditions of temperature and humidity.

Each chamber was composed of an aluminum cylinder, 2.0 m in diameter and 2.15 m high, covered by a plastic UV film. Air was forced into the chamber at the base of the cylinder and uniformly distributed within the chamber, before exiting through a wide aperture at the top of the cylinder. The system was normobaric, and pressure inside the chambers did not exceed 30 mm H₂O. In the filtered chamber, three stages of filters (Purafil, São Paulo, Brazil) were arranged serially. The first stage eliminated large particles (plain and bag filters) while the second and third stages (a model JFL-90 followed by a High Efficiency Particulate Air filter) trapped finer particles.

The 24-hour concentration of PM_{2.5} was determined gravimetrically (Chow, 1995) using Harvard impactors (Air Diagnostics and Engineering Inc., Harrison, ME, USA) equipped with polycarbonate filters at a flow rate of $10 \text{ L} \cdot \text{m}^{-1}$. Results were expressed as $\mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$. Concentrations of CO (8-hours mean, non-dispersive infrared method), NO₂ (24-hour mean, chemiluminescence method) and SO₂ (24-hour mean, pulse fluorescence method) were obtained from the monitoring station of the State of São Paulo Environmental Agency (CETESB), which was located just 100 m from the exposure chamber site. Gaseous pollutants were not retained by the filtering system, and concentrations of NO₂ and CO were similar in both chambers.

Evaluation of PM_{2.5} composition was done by elemental analysis for Na, Al, Si, P, S, K, Ca, Ti, V, Fe, Ni, Cu, Zn and Pb using a Shimadzu EDX 700 X-ray fluorescence spectrometer in valid filter samples taken from August 2005 to May 2007. In order to identify the possible pollutant sources, we conducted a principal component analysis (PCA) with varimax normalized rotation to maximize the factor loadings across variables for each factor (Schauer et al., 2006; Rajšić et al., 2008; Querol et al., 2008). Factor loadings >0.71 are typically regarded as excellent and <0.32 as very poor (Nowak, 1998). In this study, all principal factors extracted from the variables with eigenvalues >1.0 were retained, as suggested by Kaiser (1960).

Exposure Protocol

We examined four groups of second-generation (G2) animals (n=20 mice per group) that mated inside exposure chambers, receiving either filtered (F) or non-filtered (NF) air. The second generation was chosen so as not to exclude the effects caused by prenatal exposure. Exposure groups were defined as follows:

Group F1: mice that were raised and produced pregnancies in an air-filtered exposure chamber

Group F2: mice that were raised in an air-filtered chamber and completed pregnancies in a non-filtered chamber

Group NF1: mice that were raised in a non-filtered chamber and completed pregnancies in an air-filtered chamber

Group NF2: mice that were raised and completed pregnancy in a non-filtered chamber

The first generation (G1) was obtained by mating animals from the School of Medicine Animal Facility. To this end, 20-day-old mice (10 male and 10 female) were maintained either in filtered (5 couples) or non-filtered (5 couples) chambers until they attained the reproductive age of 60 days old. At this stage, individual couples were housed separately and allowed to mate. From their offspring, 10 males and 10 females were maintained in their respective chambers for 21 days. After weaning, these G1 mice were also paired and separated into different cages. On reaching reproductive age, 10 couples (5 couples per chamber) were allowed to mate and produce the G2 generation. Twenty male and 20 female G2 animals per chamber followed the same procedures as described for G1 mice. After mating, the first day of pregnancy was determined by observing a vaginal plug and the presence of spermatozoa in a vaginal smear. The G2 females that mated were then divided into the four study groups (F1, F2, NF1 and NF2) described above.

Reproductive parameters

The analysis of estrous cyclicity and ovarian follicles was performed in 20 G2 female mice from air-filtered (F) and 20 G2 females from non-filtered (NF) chambers before mating.

Estrous cyclicity

In order to verify changes in the estrous cyclicity before mating, 6-week old mice received daily (8:00-9:00 AM) vaginal lavages during 2 weeks. Estrous cyclicity was defined as the number of proestrus to estrus events during the monitored period and the total number of days in estrus exhibited by each animal during the whole period (Holson et al, 2005). The vaginal lavages were evaluated by light microscopy to classify the stage of the estrous cycle by considering the relative proportion of cornified epithelial cells, nucleated epithelial cells and leucocytes, as defined in Table 1. A person blinded to the experimental groups evaluated the smears.

Ovarian follicle counts

Assessment of ovarian toxicity in exposed nulliparous females was done by estimation of the number of ovarian follicles. For this purpose, 5 G2 female mice in estrus from each chamber were randomly selected and euthanized by i.p. injection of pentobarbital sodium (200 mg.kg⁻¹body weight). Ovaries were removed, trimmed of fat and fixed by immersion in 4% paraformaldehyde for 24 hours, then dehydrated in graded ethanol and embedded in glycolmethacrylate resin (Technovit 7100, Ax-lab, Copenhagen, Denmark). Follicle analyses were done following Bolon et al. (1997). Briefly, blocks were serially sectioned at 10 µm, and all sections were retained sequentially in slides and stained with haematoxylin and eosin. Follicles were categorized in four classes: small, growing, antral and preovulatory follicles. Small follicles included primordial (a single layer of squamous granulosa cells) and primary (a single layer of cuboidal granulosa cells) follicles. Follicles were categorized as growing if they possessed more than one layer of granulosa cells and as antral if they possessed an antral space. Preovulatory follicles were identified by the presence of a rim of cumulus cells surrounding the oocyte. Sections were analyzed beginning with the first section, and counts were made every 10 sections, providing a non-random 10% sample. Preovulatory follicles were counted separately by exact counts using all available sections.

Couple mediated endpoints

The following endpoints were assessed to evaluate the reproductive capability of G2 mice (EPA, 1996):

- Mating index (n° females with plugs /n° females cohabited) x 100
- Time to mating (time required for each pair to mate after cohabitation)
- Fertility index (n° cohabited females becoming pregnant /total n° mated females) x 100
- Pregnancy index (n° females delivering live pups/n° females with evidence of pregnancy) x100

Pregnancy outcomes

After completing the period of exposure, all females were euthanized at the 18th day of gestation by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (200 mg / kg body weight). The abdominal wall was immediately opened, and the uterus was carefully examined to determine the number of implantation sites as well as live and dead fetuses. Fetal weights were recorded, and the corpora lutea were counted under a stereomicroscope. Pre- and post-implantation losses and implantation rate were calculated as follows (EPA, 1996):

$$\text{Implantation index} = \text{Nimp} \times 100 / \text{Ncl}$$

where Nimp represents the number of implants.

$$\text{Preimplantation loss} = (\text{Ncl} - \text{Nis}) \times 100 / \text{Ncl}$$

where Ncl represents the number of corpora lutea, and Nis is the number of implantation sites.

$$\text{Postimplantation loss} = (\text{Nis} - \text{Nftp}) \times 100 / \text{Nis}$$

where Nftp represents the number of full-term pups.

Statistical analysis

All data handling and statistical analyses were performed using SPSS 13 statistical software. Means and standard deviations of means (SD) were calculated for each group. For comparison of reproductive parameters between filtered and non-filtered chambers, we used the Student's t-test or the Mann-Whitney test for independent samples. We used the chi-squared test for comparison of reproductive indexes between filtered and non-filtered chambers. One-way ANOVA multiple comparisons followed by Tukey's test or the Kuskal-Wallis test followed by the Bonferroni post hoc test were applied for comparison of pregnancy outcomes among the four studied groups. Paired samples Student's t-test was used for comparison of PM2.5 values between the two chambers. In order to monitor between-subject variation within groups, we also calculated the observed coefficient of variation (CV = standard deviation/mean) for each variable. A two-way analysis of variance (2-way ANOVA) was performed to resolve the main effects of maternal pre-gestational exposure and gestational exposure on pregnancy outcomes. This test produces an interaction term that identifies whether or not the effects of one factor (pre-gestational exposure) are influenced by the effects of the other (gestational exposure). Null hypotheses were rejected at a probability level of $P < 0.05$.

Results

Pollution levels

During the exposure period, four samples per week were taken to measure the concentrations of PM_{2.5} in the F and NF chambers. The mean concentration of PM_{2.5} in the non-filtered chamber was 27.5 µg.m⁻³ (CV = 44%), and overall values were similar to those measured in the local environment. However, the mean value (6.5 µg.m⁻³; CV = 49%) was significantly lower in the filtered chambers (P<0.001), with a mean reduction of 71% in PM_{2.5} concentration. Mean ambient levels of NO₂, CO and SO₂ were 101 µg.m⁻³ (CV = 43%), 1.81 µg.m⁻³ (CV = 50%) and 7.66 ppm (CV = 64%), respectively.

Elemental analyses conducted in 102 PM_{2.5} filters collected at the exposure site between August 2005 and May 2007 followed by PCA confirmed that vehicular emissions and crustal resuspension were the main components and contributor to PM_{2.5} mass. Table 2 shows the mean elemental composition of PM_{2.5}, obtained by energy-dispersive fluorescence X-ray analysis. PCA identified two principal factors (Table 3). The first was composed of Fe, Si, V, Zn and Cu as the main components, which are known to be present in tailpipe emissions (V, Zn and Cu) and crustal resuspension (Fe, Si). The second factor was composed of Pb and S, which are characteristic of diesel emissions.

Reproductive outcomes

Values of estrous cycle parameters and ovarian follicle counts in each chamber are presented in Table 4. Exposure to ambient air pollution affected the length of estrus cycle (p=0.001), characterized by an extended estrus and, therefore, a reduction in the number of cycles during the studied period in NF mice (P= 0.03). The number of antral follicles was significantly reduced in NF mice compared to F mice (P=0.04). We did not observe differences in the number of small, growing and preovulatory follicles between the two chambers. The CVs of all parameters were greater in the NF group compared to the F group.

Table 5 presents the values of couple-mediated endpoints in the two chambers. We observed a significant increase in time necessary to mating (P<0.001) and decrease in fertility and pregnancy indices (P=0.003) in NF couples.

Pregnancy outcomes in the four studied groups are presented in Table 6. Mean post-implantation loss rate increased in the NF2 group when compared to the F1 group (p≤0.005) and was influenced by both pre-gestational (P<0.004) and gestational (P<0.01) exposure. The difference represents a mean increase of 70% in the postimplantation loss rate. Fetal weight was significantly higher in the F1 group when compared to the other groups (p<0.001), with a 21% increase in the F1 group (0.86±0.18g) compared to the NF2 group (0.68±0.11g). Fetal weight was influenced by both pre-gestational (P<0.001) and gestational (P<0.001) exposure and exhibited a significant interaction between these two factors (P=<0.001). Litter size did not vary significantly among groups. The CVs of the pregnancy outcomes parameter, with few exceptions, were greatest in the F1 group (pre-gestational and gestational exposure to filtered air). Moreover, the differences were heightened for the indices of pre- and post-implantational losses.

Discussion

In this study, we investigated the effects of ambient levels of fine traffic generated particulate matter on reproductive and pregnancy outcomes in a two-generation model of mouse exposure. Our results demonstrate for the first time that mice exposed to air pollution present changes in estrous cyclicity and exhibit a significant reduction in the number of ovarian antral

follicles. We have also shown that reproductive and couple-mediated outcomes are adversely affected in the second generation of exposed mice, indicated by a decrease in fertility and pregnancy indices as well as a prolonged time to mating. We further demonstrated that maternal exposure before conception negatively affects fetal birth weight and post-implantation loss rate.

Previous experimental studies of our group showed that ambient levels of Sao Paulo air pollution can affect female mice fertility by decreasing the number of viable fetuses, increasing the number of implantation failures (Mohallem et al., 2005) and changing the male/female ratio (Lichtenfels et al., 2007) in the first generation of exposed mice. These findings are in line with epidemiological studies that established an association between exposure to air pollution and adverse effects on reproductive health (Wang et al., 1997; Bobak and Leon, 1992; Selevan et al., 2000; Woodruff et al., 2003; Huynh et al., 2006; Ritz et al., 2007; Slama et al., 2007). The present study confirmed our previous findings of decreased fertility and also showed that a two-generation exposure to air pollution resulted in alterations to other reproductive outcomes, such as a significant decrease in fetal weight.

To the best of our knowledge, this is the first study that investigated the association between air pollution exposure and estrous cyclicity, ovarian follicle counts and time to mating. Monitoring the estrous cycle provided us information about the length and alterations in cyclicity, such as the induction of persistent estrus. This may reflect impaired ovulation and changes in circulating ovarian hormones levels. Extended vaginal estrus usually indicates that the female cannot spontaneously achieve the ovulatory surge of LH (Huang and Meites, 1975). Persistent estrus typically occurs in response to toxicant agents that have estrogenic properties or the ability to block ovulation (EPA, 1996).

Although we did not observe significant reduction in the number of preovulatory follicles, the number of antral follicles was reduced. Antral follicles represent the last stage in follicle development prior to ovulation and are the only follicle type capable of releasing an oocyte for fertilization and synthesizing estrogen (Hirshfield, 1997), which is essential for normal menstrual and estrous cyclicity. Any increase in the rate of follicle depletion can potentially raise the possibility of early sexual senescence (premature ovarian failure), and early menopause in the case of humans (Rowe, 2006). This can be particularly important due to the documented increase in the number of women in large urban centers bearing children in the late 30- and 40-year-old age groups (Gindoff and Jewelewicz, 1986).

The decrease in fertility index observed in our animals could be explained by different factors: alteration in the neuroendocrine-gonadal axis, hormonal imbalance, estrous cycle disruptions, altered maternal environment, compromised sperm quality and impaired sexual behavioral (Selevan et al., 2000; Holson et al., 2005). Both male and female mice were exposed in our study; therefore, the observed decrease in fertility should be considered a general indicator of reproductive toxicity.

We found that exposure to air pollution during gestation affected fetal development significantly by reducing birth weight, with a mean reduction of 21% in the NF2 group compared with non-exposed mice (F1). Interestingly, exposure only during the pre-gestational period also resulted in a reduction in birth weight. We further observed a significant interaction effect that exacerbated the fetal weight reduction in mice exposed during both periods. We have recently shown that placental development is affected by maternal exposure to the same environmental conditions, which could represent one of the mechanisms involved in the impairment of fetal development of these mice (Veras, et al, 2008).

Similarly to the results observed for fetal weight, exposure during gestation and/or during the pre-gestational period determined an increase in post-implantation losses. The heightened effect of pre-gestational exposure to air pollution suggests

that systemic changes or a compromised uterine environment prior to pregnancy may be involved. In mammals, most embryonic losses occur during the critical period of early pregnancy, probably due to the major developmental events that occur during this stage, such as the formation of the placenta and embryonic organogenesis (Reynolds and Redmer, 2001). Preparation of the uterine endometrium for implantation is another key point for successful maternal fetal interaction and is under the control of sequential estrogen and progesterone stimulation. Chemicals found in our filters (Pb, Cd) are known to affect the internal hormonal environment and to inhibit the synthesis of growth factors and mitosis or cell differentiation that could impair implantation and cause embryonic losses (Watanabe, et al., 1979, Wide, 1985; Yang et al., 2004).

Toxicological studies have shown that certain toxicants present in ambient air pollution, such as PAH and heavy metals, are ovotoxic and potential endocrine disruptors, which interfere with ovarian function leading to follicle depletion, follicular growth arrest and early ovarian failure (Mattison, 1982; Mattison et al., 1983; Mattison and Thomford, 1989, Hoyer and Sipes, 1996; Borman et al., 2000; Miller et al., 2004). Previous analyses of emission samples generated by fossil fuel combustion have confirmed the presence of many aromatic carbonyls, long chain alcohols, PAHs and PAH-derivatives, as well as substituted phenolic compounds and derivatives, which have been reported as environmental estrogens that could disrupt the hypothalamic-pituitary-gonadal axis and thus affect ovulatory cycle and fertility (Jingxian et al., 2003; Miller et al., 2004; Furuta et al., 2004). In large urban areas, diesel and gasoline engine exhausts are one of the main sources of particulate pollution emissions, determining the qualitative aspects of ambient PM and its chemical and toxicological characteristics (Kok et al., 2006). Elemental analyses conducted in our PM_{2.5} filters collected at the exposure site revealed the presence of several heavy metals such as V, Cu, Pb and Zn, most likely involved in the observed toxic effects of air pollution. Although we cannot identify the exact mechanisms involved in the decreased reproductive capability and impairment of fetal development, our data suggest that components present in air pollution interfere or impair the reproductive processes that modulate hormonal signaling pathways or directly cause organ damage that would compromise function.

In conclusion, our study demonstrated that exposure to ambient levels of urban traffic generated particulate matter negatively affects different functions and stages of the reproductive process. Our results also reinforce the idea that maternal exposure to air pollution before gestation is critical for pregnancy outcomes.

Acknowledgements

We thank Ana J. Lichtenfels, Regiani C. de Oliveira for PM_{2.5} monitoring and Dr. Thais Mauad and Regiani Carvalho de Oliveira for PCA analysis.

References

- Bobak, M., 2000. Outdoor air pollution, low birth weight, and prematurity. *Environ. Health Perspect.* 108, 173-176.
- Bobak, M., Leon, D.A., 1992. Air pollution and infant mortality in the Czech Republic, 1986-1988. *Lancet*, 340, 1010-1014.
- Bobak, M., Leon, D.A., 1999. Pregnancy outcomes and outdoor air pollution: an ecological study in districts of the Czech Republic 1986-8. *Occup. Environ. Med.* 56, 539-543.
- Bolon, B., Bucci, T.J., Warbritton, A.R., Chen, J.J., Mattison, D.R., Heindel, J.J., 1997. Differential follicle counts as a screen for chemically induced ovarian toxicity in mice: results from continuous breeding bioassays. *Fundam. Appl. Toxicol.* 39, 1-10.
- Borman, S.M., Christian, P.J., Sipes, I.G., Hoyer, P.B., 2000. Ovotoxicity in female Fischer rats and B6 mice induced by low-dose exposure to three polycyclic aromatic hydrocarbons: comparison through calculation of an ovotoxic index. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 167,191-198.

- CETESB, 2005. Caracterização das Estações da Rede Automática de Monitoramento da Qualidade do Ar na RMSP Estação Cerqueira César. CETESB 2005 Technical Report (<http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/relatorios.asp> accessed on 20 January, 2008).
- Chow, J.C., 1995. Measurement methods to determine compliance with ambient air quality standards for suspended particles. *J. Air. Waste Manage. Assoc.* 45, 320-382.
- Dejmek, J., Jelínek, R., Solansky, I., Benes, I., Srám, R.J., 2000a. Fecundability and parental exposure to ambient sulfur dioxide. *Environ. Health Perspect.* 108, 647-654.
- Dejmek, J., Selevan, S.G., Benes, I., Solanský, I., Srám, R.J., 1999. Fetal growth and maternal exposure to particulate matter during pregnancy. *Environ. Health Perspect.* 107, 475-480.
- Dejmek, J., Selevan, S.G., Benes, I., Solanský, I., Srám, R.J., 2000b. Maternal exposure to dust particles during pregnancy and fetal growth in 2 regions with different levels of air pollution. *Cas. Lek. Cesk.* 139, 177-182.
- Dejmek, J., Solanský, I., Benes, I., Leníček, J., Srám, R.J., 2000c. The impact of polycyclic aromatic hydrocarbons and fine particles on pregnancy outcome. *Environ. Health Perspect.* 108, 1159-1164.
- Furuta, C., Suzuki, A.K., Taneda, S., Kamata, K., Hyashi, H., Mori, Y., Li, C., Watanabe, G; Taya, K., 2004. Estrogenic activities of nitrophenols in diesel exhaust particles. *Biol. Reprod.* 70, 1527-1533.
- Gindoff, P.R., Jewelewicz, R., 1986. Reproductive potential in the older woman. *Fertil. Steril.* 46:989-1001.
- Gouveia, N., Bremner, S.A., Novaes, H.M., 2004. Association between ambient air pollution and birth weight in São Paulo, Brazil. *J. Epidemiol. Community Health.* 58:11-17.
- Ha, E.H., Hong, Y.C., Lee, B.E., Woo, B.H., Schwartz, J., Christiani, D.C., 2001. Is air pollution a risk factor for low birth weight in Seoul? *Epidemiology.* 12, 643-648.
- Hirshfield, A. N., 1997. Overview of ovarian follicular development: Considerations for the toxicologist. *Environ. Mol. Mutagen.* 29, 10-15.
- Holson, J.F., Nemecek, M.D., Stump, D.G., Kaufman, L.E., Lindstrom, L., Varsho, B.J., 2005. Significance reliability and interpretation of developmental and reproductive toxicity study findings. In: Hood, R. (Ed), *Developmental and Reproductive Toxicology: A practical approach*. Tylor & Francis, USA, pp. 329-424.
- Hoyer, P.B., Sipes, I.G., 1996. Assessment of follicle destruction in chemical-induced ovarian toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* 36:307-331.
- Huang, H.H., Meites, J., 1975. Reproductive capacity of aging female rats. *Neuroendocrinology*, 17, 289-295.
- Huynh, M., Woodruff, T.J., Parker, J.D., Schoendorf, K.C., 2006. Relationships between air pollution and preterm birth in California. *Pediatr. Perinat. Epidemiol.* 20, 454-461.
- Jingxian, W.; Wenzhong, W.; Henkelmann, B.; Li, Y.; Kettrup, A.; Schramm, K.W., 2003. Presence of estrogenic activity from emission of fossil fuel combustion as detected by a recombinant yeast bioassay. *Atmos. Environ.* 37, 3225-3235.
- Kaiser, H.F., 1960. The application of electronic computers to factor analysis. *Educ. Psychol. Meas.* 20:141-151.
- Knight, J.A.; Marrett, L.D., 1997. Parental Occupational Exposure and the Risk of Testicular Cancer in Ontario. *Occup. Environ. Med.* 39, 333-338.
- Kok, T.M.C.M., Driece, H.A.L.; Hogervorst, J.G.F.; Briede J.J., 2006. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. *Mut. Res.* 613, 103-122.
- Lee, B.E., Ha, E.H., Park, H.S., Kim, Y.J., Hong, Y.C., Kim, H., Lee, J.T., 2003. Exposure to air pollution during different gestational phases contributes to risks of low birth weight. *Human Reprod.* 18, 638-643.
- Lichtenfels, A.J., Gomes, J.B., Pieri, P.C., El Khouri Miraglia, S.G., Hallak, J., Saldiva, P.H., 2007. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil. *Fertil Steril.* 87, 230-232.
- Maisonet, M., Bush, T.J., Correa, A., Jaakkola, J.J.K., 2001. Relation between ambient air pollution and low birth weight in the Northeastern United States. *Environ. Health. Perspect.* 109 (Suppl), S351-S356.
- Mattison D.R., Nightingale M.S., Shiromizu K., 1983. Effects of toxic substances on female reproduction. *Environ. Health Perspect.* 48, 43-52.
- Mattison, D.R., 1982. The effects of smoking on fertility from gametogenesis to implantation. *Environ Res.* 28, 410-433.
- Mattison, D.R., Thomford, P.J., 1989. The mechanisms of action of reproductive toxicants. *Toxicol Pathol.* 17, 364-376.
- Miller, K.P., Borgeest, C., Greenfeld, C., Tomic, D., Flaws, J.A., 2004. In utero effects of chemicals on reproductive tissues in females. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 198, 111 -131.
- Mohallem, S.V., Araujo Lobo, D.J., Pesquero, C.R., Assunção, J.V., de Andre, P.A., Saldiva, P.H., Dolnikoff, M., 2005. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. *Environ. Res.* 98, 196-202.
- Mohorovic, L., 2004. First two months of pregnancy- critical time for preterm delivery and low birthweight caused by adverse effects of coal combustion toxics. *Early Human Dev.* 80, 115-123.
- Nowak, B., 1998. Contents and relationship of elements in human hair for a non-industrialized population in Poland. *Sci. Total Environ.* 209, 59-68.
- O'Halloran, K., Spickett, J.T., 1992. The interaction of lead exposure and pregnancy. *Asia Pac. J. Public Health.* 6, 35-39.
- Perera, F.P., Jedrychowski, W., Rauh, V., Whyatt, R.M., 1999. Molecular epidemiologic research on the effects of environmental pollutants on the fetus. *Environ. Health Perspect.* 107, 451-460.

- Querol, X., Pey, J., Minguillón, M.C., Pérez, N., Alastuey, A., Viana, M., Moreno, T., Bernabé, R.M., Blanco, S., Cárdenas, B., Vega, E., Sosa, G., Escalona, S., Ruiz, H., Artíñano, B., 2008. PM speciation and sources in Mexico during the MILAGRO-2006 Campaign Atmos. Chem. Phys. 8: 111–128.
- Rajšić, S., Mijić, Z., Tasić, M., Radenković, M., Joksic, J., 2008. Evaluation of the levels and sources of trace elements in urban particulate matter. Environ. Chem. Lett. 6, 95–100.
- Reynolds, L.P., Redmer, D.A., 2001. Angiogenesis in the placenta. Biol. Reprod., 64, 1033–1040.
- Ritz, B., Chapa G., Fruin, S., 2000. Effect of air pollution on preterm brth among children born in Southern California between 1989 and 1993. Epidemiology. 11, 502–511.
- Ritz, B., Wilhelm, M., Hoggatt, K.J., Ghosh, J.K., 2007. Ambient air pollution and preterm birth in the environment and pregnancy outcomes study at the University of California, Los Angeles. Am. J. Epidemiol., 166,1045–1052.
- Rogers, J.F., Dunlop, A.L., 2000. Air pollution and very low birth weight infants: a target population? Pediatrics, 118, 156–164.
- Rowe, T., 2006. Fertility and a woman's age. J. Reprod. Med. 51,157–163.
- Rubes, J., Selevan, S.G., Evenson, D.P., Zudova, D., Vozdova, M., Zudova, Z., Robbins, W.A., Perreault, S.D., 2005. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. Hum. Reprod. 20, 2776–2783.
- Schauer, J.J., Lough, G.C., Shafer, M.M., Christensen, W.F., Arndt, M.F., DeMinter, J.Y., Park, J.S., 2006. Characterization of metals emitted from motor vehicles. Res. Rep. Health Eff. Inst., 133, 1–76.
- Selevan, S.G., Borkovec, L., Slott, V.L., Zudová, Z., Rubes, J., Evenson, D.P., Perreault, S.D., 2000. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. Environ. Health Perspect. 108, 887–894.
- Shaw, G.M., Gold, E.B., 1998. Methodological considerations in the study of parental occupational exposures and congenital malformations in offspring. Scand. J. Work Environ. Health. 14, 344–355.
- Silbergeld, E.K., Patrick, T.E., 2005. Environmental exposures, toxicologic mechanisms, and adverse pregnancy outcomes. Am. J. Obstet. Gynecol., 192, 11–21.
- Slama, R., Morgenstern, V., Cyrus, J., Zutavern, A., Herbarth, O., Wichmann, H.E., Heinrich, J., LISA Study Group., 2007. Traffic-related atmospheric pollutants levels during pregnancy and offspring's term birth weight: a study relying on a land-use regression exposure model. Environ. Health Perspect. 115, 1283–1292.
- Srám, R.J., Binková, B., Dejmek, J., Bobak, M., 2005. Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature Environ. Health Perspect. 113, 375–382.
- U.S. EPA., 1996. Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. U.S. Environmental Protection Agency, Risk Assessment Forum, Washington, DC, 630/R-96/009, 1996. (<http://www.epa.gov/NCEA/raf/pdfs/devtox.pdf> accessed on June 2006)
- Veras, M.M., Damaceno-Rodrigues, N.R., Caldini, E.G., Ribeiro, A.A.C.M., Mayhew, T.M., Saldiva, P.H.N., Dollnikoff, M., 2008. Particulate Urban Air Pollution Affects the Functional Morphology of Mouse Placenta. Biol. Reprod. May 2008 [Epub ahead of print].
- Wang, L., Pinkerton, K.E., 2007. Air pollutant effects on fetal and early postnatal development. Birth Defects Res. C. Embryo Today. 81, 144–154.
- Wang, X., Ding, H., Ryan, L., Xu, X., 1997. Association between air pollution and low birth weight: a community-based study. Environ. Health Perspect. 105, 514–520.
- Watanabe, T., Shimada, T., Endo, A., 1979. Mutagenic effects of cadmium on mammalian oocyte chromosomes. Mutat. Res. 67, 349–356.
- WHO European Centre for Environment and Health, 2005. Effects of air pollution on children's health and development- a review of the evidence. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe, 2005. (<http://www.euro.who.int/document/E86575.pdf>, accessed 10 September 2007).
- WHO, 2003. Health aspects of air pollution with particulate matter, ozone and nitrogen dioxide. Report on a WHO Working Group Bonn, Germany 13–15 January 2003 (<http://www.euro.who.int/document/e79097.pdf>, accessed 7 September 2007)
- Wide, M., 1985. Lead exposure on critical days of fetal life affects fertility in the female mouse. Teratology. 32, 375–380.
- Woodruff, T.J., Parker, J.D., Kyle, A.D., Schoendorf, K.C., 2003. Disparities in exposure to air pollution during pregnancy. Environ. Health Perspect. 111, 942–946.
- Xu, X., Ding, H., Wang, X., 1995. Acute effects of total suspended particles and sulfur dioxides on preterm delivery: a community based cohort study. Arch. Environ. Health. 50, 407–415.
- Yang, P.M., Chiu, S.J., Lin, K.A., Lin, L.Y., 2004. Effect of cadmium on cell cycle progression in Chinese hamster ovary cells. Chem. Biol. Interact. 149,,125–136.

Table 1. Classification of the stages of the estrous cycle according to the vaginal cytology.

Stage of the estrous cycle	Proportion of cell types (%)		
	Cornified epithelial cells	Nucleated epithelial cells	Leucocytes
Diestrus			$\geq 60\%$
Proestrus		$\geq 60\%$	$\leq 10\%$
Metaestrus	$\geq 60\%$		$\geq 20\%$
Estrus	$\geq 90\%$		

Table 2. Descriptive analysis of elemental composition present in $PM_{2.5}$ samples from the exposure site by Energy Dispersive Fluorescence X-Ray. Carbon (C) was used as a standard to calculate relative elements composition. Data are presented as means and SD for n=91 to n=102 measurements.

$PM_{2.5}$ elements	Mean (SD) in $\mu\text{g.g}^{-1}$	Sample size
Mass	0.47 (0.03) mg	97
Al	5054 (668)	101
Ca	3271 (541)	102
Cu	238.6 (34.0)	102
Fe	3182 (620)	102
K	2720 (395)	102
Na	5540 (246)	91
Ni	40.68 (5.97)	102
P	1415 (184)	102
Pb	97.96 (23.8)	102
S	9837 (1021)	102
Si	3545 (406)	102
Ti	188.1 (42.6)	102
V	64.78 (9.06)	102
Zn	757.8 (110)	102
C	98.0 (0.30) %	102

Table 3. Principal component analysis after varimax rotation for the elements analyzed in PM_{2.5}.

<i>PM_{2.5} elements</i>	Factor 1	Factor 2
Cu	0.859	0.273
Fe	0.961	0.020
Ni	0.663	0.255
Si	0.756	-0.209
V	0.895	0.171
Zn	0.782	0.252
Pb	0.134	0.806
S *	0.065	0.708

* Sulphur (S) is added to gas and diesel to improve combustion in Brazil

Table 4. Estrous cycle parameters and ovarian follicular counts in G2 mice.

Parameter		n	Group				p
			F		NF		
			Mean (SD)	CV	Mean (SD)	CV	
N° cycles*		20	2.6 (0.22)	8%	1.2 (0.29)	34%	0.001
% days in estrus/period		20	34.57 (6.68)	19%	56.63 (11.65)	20%	0.03
Number of days in estrus		20	4.1(0.8)	19%	6.8(1.4)	20%	0.001
Number of Follicles							
	small	5	346(52.5)	15%	240.7(123.7)	51%	ns
	growing	5	160.6 (30.9)	19%	128.2 (26.5)	20%	ns
	antral	5	118.6 (18.4)	15%	75(35.2)	46%	0.04
	preovulatory	5	10.6 (2)	18%	6.6(3.9)	25%	ns
	total number	5	635.8 (74.4)	11%	450.5 (178.1)	39%	ns

F=filtered, NF=non-filtered, *number of cycles during the studied period

Table 5. Mean (SD) values of couple-mediated outcomes.

Parameter	n	Group		<i>p</i>
		F	NF	
Mating index (%)	20	100	100	ns
Time to mating (n° of days)	20	3.5 (1.54)	10.65 (5.77)	0.0001
Fertility index (%)	20	95	55	0.003
Pregnancy index (%)	20	95	55	0.003

F=filtered, NF=non-filtered

Table 6. Mean (SD) values of pregnancy outcomes.

		Group								
Parameter	n	F1		F2		NF1		NF2		<i>p</i>
		Mean (SD)	CV	Mean (SD)	CV	Mean(SD)	CV	Mean (SD)	CV	
N° live fetus per litter	10	6.8 (2.78)	41%	7(2.09)	29%	6.44 (2.83)	43%	5.88 (2.02)	34%	ns
N° dead fetus per litter	10	0	0	0.18 (0.4)	>100%	0.1(0.33)	>100%	0.11(0.33)	>100%	ns
Implantation index (%)	10	92.5(4.1)	4%	87.2(4.8)	5%	84.1(4.2)	4%	85.4(4.4)	5%	ns
Preimplantation loss (%)	10	7.5 (4.7)	62%	12.7(4.7)	37%	15.8(4.2)	26%	14.5(4.3)	30%	ns
Postimplantation loss (%) ^{a,b}	10	12.1 (5.8)	47%	26.3(3.9)	14%	29.7(5.7)	19%	41.7(5.8)	13%	0.005
Fetal weight (g) ^{a,b,c}	10	0.866(0.18)	20%	0.694(0.07)	10%	0.722(0.1)	13%	0.682(0.11)	16%	0.0001

^asignificant effect of pre-gestational exposure. ^bsignificant effect of gestational exposure, ^csignificant interaction effect