

Mariangela Maluf

**Efeitos da exposição crônica à poluição atmosférica
particulada sobre o desenvolvimento embrionário pré-
implantacional *in vitro* em camundongos**

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

Área de concentração: Patologia
Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

São Paulo

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Mariangela Maluf

**Efeitos da exposição crônica à poluição atmosférica
particulada sobre o desenvolvimento embrionário
pré-implantacional *in vitro* em camundongos**

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

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento
Saldiva

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Maluf, Mariangela

Efeitos da exposição crônica à poluição atmosférica particulada sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional *in vitro* em camundongos / Mariangela Maluf. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Paulo Hilário Nascimento Saldiva.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Material particulado 3.Fertilização *in vitro*/métodos 4.Desenvolvimento embrionário 5.Blastocisto 6.Massa celular interna do blastocisto 7.Coloração e rotulagem/métodos 8.Reprodução 9.Camundongos

USP/FM/SBD-201/08

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada aos meus pais,
Josefina e Fauzi, pelo apoio e
incentivo oferecidos ao longo de
toda a minha vida e à querida
memória dos meus avós, Joana e
Felício, os quais teriam muito
orgulho de ver sua neta obter o título
de “doutora”.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, cuja visão inovadora e entusiasmo serviram de inspiração para o meu retorno à vida acadêmica.

Ao meu marido Paulo, amado companheiro, admirado e admirável na vida e na profissão. Eu lhe sou grata por suas idéias, críticas e auxílio ímpar na elaboração desta tese.

Aos meus amados filhos, Marcela e Paulo Otavio, pela inspiração, motivação e inovação que trouxeram para a minha vida.

Ao meu querido irmão, Prof. Dr. Fauze Maluf Filho, eterna fonte de inspiração científica.

À Dra. Ingrid Ramos Rocha e Silva, sem a qual jamais teria retornado à vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Luis A. A. Pereira, por sua incansável disposição em fornecer dados históricos dos níveis de poluentes ambientais da cidade de São Paulo, solicitados sempre em caráter de urgência.

À pós-graduanda Daniela Aparecida Nicolosi Foltran Januário, por toda a dedicação e auxílio no cuidado dos animais e na execução dos experimentos.

Ao bioestatístico Alessandro M. Mazzoni, pelas intermináveis horas necessárias para encontrar em conjunto soluções para as análises estatísticas dos diferentes projetos.

A todos os membros do Laboratório de Poluição Atmosférica Ambiental, em particular à Dra. Ana Júlia de Faria Coimbra Lichtenfels, que direta ou indiretamente contribuíram com diligência e empenho para esta linha de pesquisa.

*“O destino corrente de uma nova verdade é começar como heresia e acabar
como superstição”.*

Thomas Henry Huxley (1825-1895)

SUMÁRIO

Listas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Linhas de pesquisa desenvolvidas.....	4
1.2 Poluição ambiental e saúde.....	6
1.3 Infertilidade conjugal.....	8
1.4 Poluição ambiental e saúde reprodutiva.....	10
1.5 Desafios.....	16
2 OBJETIVOS.....	28
2.1 Projeto Coloração Diferencial.....	29
2.2 Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Início da Vida Reprodutiva.....	30
2.3 Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Final da Vida Reprodutiva.....	31
3 MÉTODOS.....	32
4 RESULTADOS.....	33
4.1 Projeto Coloração Diferencial.....	34

4.2 Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Início da Vida Reprodutiva.....	36
4.3 Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Final da Vida Reprodutiva.....	38
5 DISCUSSÃO.....	41
6 CONCLUSÕES.....	64
6.1 Projeto Coloração Diferencial.....	65
6.2 Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Início da Vida Reprodutiva.....	66
6.3 Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Final da Vida Reprodutiva.....	67
7 ANEXOS.....	68
7.1 Anexo A.....	69
7.2 Anexo B.....	95
7.3 Anexo C.....	135
8 REFERÊNCIAS.....	174

LISTA DE TABELAS

Projeto Coloração Diferencial

- Tabela 1** – Efeitos de duas concentrações diferentes de detergente para a permeabilização parcial e iodeto de propídeo para a coloração das células do trofoectoderma sobre o escore de avaliação da qualidade da coloração diferencial em blastocistos de acordo com a solução de fixação utilizada..... **87**
- Tabela 2** – Resultados da análise de variância do efeito dos protocolos individuais sobre o escore de qualidade de coloração, incluindo a interação fatorial completa entre os protocolos..... **88**
- Tabela 3** – Efeitos das diferentes soluções fixadoras sobre o escore de qualidade de coloração..... **89**
- Tabela 4** – Efeitos de duas concentrações diferentes de iodeto de propídeo e de detergente a contagem celular diferencial em blastocistos de acordo com a solução de fixação utilizada..... **90**
- Tabela 5** – Modelo geral de análise linear multivariada: efeitos individuais das variáveis independentes e interação fatorial completa entre variáveis..... **91**
- Tabela 6** – Modelo geral de análise linear multivariada: efeitos individuais das variáveis independentes e interação fatorial completa entre variáveis..... **92**

Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Início da Vida Reprodutiva

- Tabela 1** – Avaliação das variáveis reprodutivas de fêmeas grávidas de camundongos da linhagem Swiss Albino no momento do parto de acordo com a exposição pré-natal ao ar filtrado (AF) ou ambiente (AA)..... **125**
- Tabela 2** – Resposta ovariana de fêmeas de camundongo da linhagem Swiss Albino à estimulação após a exposição pré e/ou pós-natal ao ar filtrado (AF) ou ambiente (AA).. **126**

Tabela 3 – Efeitos da exposição pré e/ou pós-natal de fêmeas de camundongo ao ar filtrado (AF) e/ou ambiente (AA) sobre o desenvolvimento embrionário e especificação das linhagens celulares de acordo com a resposta ovariana. Para explicação do escore discriminatório (<i>Escore D</i>), ver texto.....	127
Tabela 4 – Modelo geral de análise linear multivariada: efeitos individuais das variáveis independentes e interação fatorial completa entre variáveis.....	128
Tabela 5 – Efeitos do padrão de resposta ovariana à estimulação sobre a fertilização e desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> em fêmeas de camundongo da linhagem Swiss Albino.....	129
Tabela 6 – Efeitos da exposição pré e/ou pós-natal de fêmeas de camundongo da linhagem Swiss Albino ao ar filtrado (AF) e/ou ambiente (AA) sobre a especificação das linhagens celulares dos embriões em estágio de blastocisto. Protocolos de exposição com valores médios das várias dependentes que não mostraram diferença entre si foram agrupados em conjuntos homogêneos.....	130

Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Final da Vida Reprodutiva

Tabela 1 – Avaliação das variáveis reprodutivas de fêmeas grávidas de camundongos da linhagem Swiss Albino no momento do parto de acordo com a exposição pré-natal ao ar filtrado (AF) ou ambiente (AA).....	166
Tabela 2 – Efeitos da exposição pré e/ou pós-natal de fêmeas de camundongo ao ar filtrado (AF) e/ou ambiente (AA) sobre o desenvolvimento embrionário <i>in vitro</i> e especificação das linhagens celulares (massa celular interna, MCI; trofotoderma, TE) de acordo com a resposta ovariana. Para explicação do escore discriminatório (<i>Escore D</i>), ver texto.....	167
Tabela 3 – Modelo geral de análise linear multivariada: efeitos individuais das variáveis independentes e interação fatorial completa entre variáveis.....	168

Tabela 4 – Efeitos da exposição pré e/ou pós-natal de fêmeas de camundongo da linhagem Swiss Albino ao ar filtrado (AF) e/ou ambiente (AA) sobre a especificação das linhagens celulares (massa celular interna, MCI; trofotoderma, TE) em blastocistos no quinto dia de desenvolvimento *in vitro*. Protocolos de exposição com valores médios das várias dependentes que não mostraram diferença entre si foram agrupados em conjuntos homogêneos.....

LISTA DE FIGURAS

Projeto Coloração Diferencial

- Figura 1** – Escore de qualidade de coloração diferencial de blastocistos intactos produzidos através de fertilização *in vitro*: (a) Escore 1: morfologia nuclear pobremente preservada, maioria ou todos os núcleos corados pela bisbenzimidida (azul); (b) Escore 2: morfologia nuclear bem preservada, coloração inespecífica dos núcleos pelo iodeto de propídeo (vermelho/rosa); (c) Escore 3: morfologia nuclear bem preservada, coloração específica, porém com dificuldade na diferenciação entre os núcleos da massa celular interna (MCI) em azul e do trofoectoderma (TE) em rosa; (d) Escore 4: morfologia nuclear bem preservada, coloração específica, e fácil diferenciação entre os núcleos da MCI em azul e do TE em rosa..... 94

Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Início da Vida Reprodutiva

- Figura 1** – Desenho experimental (valores dentro de caixas representam o número de fêmeas de camundongo). GD = dia gestacional; SO = superovulação; IVF = fertilização *in vitro*; D = dia; IVC = cultura *in vitro*..... 132
- Figura 2** – Gráfico de caixas demonstrando a distribuição do o número total de células (a), o número de células da massa celular interna (MCI) (b), o número de células do trofoectoderma (TE) (c) e a razão MCI/TE (d) em blastocistos produzidos através da fertilização *in vitro* de fêmeas de camundongo da linhagem Swiss Albino expostas no período pré e pós-natal ao ar filtrado (AF) e/ou ambiente (AA). Os limites da caixa (inferior e superior) representam o 25º e 75º percentil e a linha central representa a mediana (50º percentil). O comprimento da caixa representa o intervalo interquartil (IQR). O valor superior adjacente é a maior observação que é igual ou menor ao 75º percentil mais uma vez e meia o IQR. O valor inferior adjacente é a menor observação que é igual ou maior ao 25º percentil menos uma vez e meia o IQR..... 133

Figura 3 – Coloração diferencial de blastocistos obtidos de fêmeas de camundongo da linhagem Swiss Albino expostas no período pré e pós-natal ao ar filtrado (AF) e/ou ambiente (AA): (a) Grupo AF-AF, (b) Grupo AF-AA e (c) Grupo AA-AA. O azul e o rosa indicam as células da massa celular interna (MCI) e do trofoectoderma (TE), respectivamente..... **134**

Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Final da Vida Reprodutiva

Figura 1 – Desenho experimental (valores dentro de caixas representam o número de fêmeas de camundongo). GD = dia gestacional; SO = superovulação; IVF = fertilização *in vitro*; D = dia; IVC = cultura *in vitro*..... **171**

Figura 2 – Gráfico de caixas demonstrando a distribuição do o número total de células (a), o número de células da massa celular interna (MCI) (b), o número de células do trofoectoderma (TE) (c) e a razão MCI/TE (d) em blastocistos produzidos através da fertilização *in vitro* de fêmeas de camundongo da linhagem Swiss Albino expostas no período pré e pós-natal ao ar filtrado (AF) e/ou ambiente (AA). Os limites da caixa (inferior e superior) representam o 25^o e 75^o percentil e a linha central representa a mediana (50^o percentil). O comprimento da caixa representa o intervalo interquartil (IQR). O valor superior adjacente é a maior observação que é igual ou menor ao 75^o percentil mais uma vez e meia o IQR. O valor inferior adjacente é a menor observação que é igual ou maior ao 25^o percentil menos uma vez e meia o IQR..... **172**

Figura 3 – Coloração diferencial de blastocistos obtidos de fêmeas de camundongo com cinco meses de idade da linhagem Swiss Albino expostas no período pré e pós-natal ao ar filtrado (AF) e/ou ambiente (AA): (a) Grupo AF-AF, (b) Grupo AF-AA e (c) Grupo AA-AA. O azul e o rosa indicam as células da massa celular interna (MCI) e do trofoectoderma (TE), respectivamente..... **173**

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	ar ambiente
AF	ar filtrado
AhR	receptor de hidrocarboneto aromatic
ANOVA	análise de variância
ATP	adenosina tri-fosfato
Bax	proteína X associada ao Bcl2
Cdx2	<i>caudal-type homeobox 2</i>
CIUR	crescimento intra-uterino retardado
D	dia
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNMTs	DNA metiltransferases
Dr.	doutor
Dra.	doutora
eCG	gonadotrofina coriônica eqüina
ESCA	esterilidade sem causa aparente
et al.	e outros
etc.	et Cetera
EtOH	etanol
FIV (IVF)	fertilização <i>in vitro</i>
FIVETE	fertilização <i>in vitro</i> e transferência de embriões
GD	dia gestacional

HAP	hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HSA	soroalbumina humana
HSD	diferença honestamente significativa
HTF	fluido tubário humano
IP	iodeto de propídeo
IQR	faixa interquartil
IU	unidade internacional
IVC	cultura <i>in vitro</i>
KSOM	meio simples otimizado enriquecido com potássio
LPM	litros por minuto
MANOVA	análise de multivariância
MCI	massa celular interna
mHTF	fluido tubário humano modificado
MP	material particulado
MP_{2,5}	material particulado com diâmetro aerodinâmico < 2,5µm
MP₁₀	material particulado com diâmetro aerodinâmico < 10 µm
MEtOH	metanol
Nanog	fator de transcrição homeobox Nanog
Oct4	<i>octamer-4</i>
p.ex.	por exemplo
PFA1%	paraformaldeído 1%
PFA4%	paraformaldeído 4%

POU	família de fatores de transcrição: <i>Pituitary-specific Pit-1</i> , <i>Octamer Oct-1 e Oct-2</i> , <i>Unc-86 neural</i>
Prof.	professor
RNA	ácido ribonucléico
SD	desvio padrão
SO	superovulação
SSS	suplemento substituto de soro
TE	trofoectoderma
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUDP</i> <i>nick end labeling</i>
TX-100	Triton X-100

LISTA DE SIGLAS

ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
EUA	Estados Unidos da América
NIEHS	<i>National Institute of Environmental Health Sciences</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

cm	centímetro
CO	monóxido de carbono
CO₂	dióxido de carbono
m	metro
NO₂	dióxido de nitrogênio
m³/min	metro cúbico por minuto
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	mililitro
mm	milímetro
n	número
nm	nanômetro
O₃	ozônio
pH	potencial de hidrogênio
SO₂	dióxido de enxofre
~	aproximadamente igual a
°C	graus Celsius
=	igual a
≥	maior ou igual a
>	maior que
±	mais ou menos
≤	menor ou igual a

<	menor que
$\mu\text{g}/\text{m}^3$	micrograma por metro cúbico
$\mu\text{g}/\text{mL}$	micrograma por mililitro
μL	microlitro
μm	micrometro
%	porcentagem

RESUMO

Maluf, M. Efeitos da exposição crônica à poluição atmosférica particulada sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional *in vitro* em camundongos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 181p.

Um Projeto Temático de Pesquisa foi desenvolvido no Laboratório de Poluição Ambiental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o objetivo de avaliar os efeitos da exposição aguda/crônica ao ar ambiente de um grande centro urbano sobre a saúde. Dentro deste projeto, uma linha de pesquisa foi dedicada ao estudo dos efeitos dessa exposição sobre a saúde reprodutiva feminina. Evidências de estudos epidemiológicos e experimentais implicam os fatores ambientais na infertilidade humana e resultado obstétrico adverso. Contudo, poucos estudos foram conduzidos até o presente para avaliar um possível efeito da exposição à poluição ambiental particulada sobre a saúde reprodutiva feminina. Portanto, o objetivo dos projetos da minha linha de pesquisa é fornecer dados que possam demonstrar os possíveis efeitos da exposição crônica à poluição ambiental particulada sobre a função ovariana e o desenvolvimento embrionário inicial. O objetivo do primeiro projeto desta tese foi avaliar diferentes metodologias utilizadas para a coloração diferencial das linhagens celulares do blastocisto, um método mais adequado para a avaliação de sua qualidade e normalidade. As células de blastocistos intactos de camundongo obtidos através de fertilização *in vitro* (FIV) foram permeabilizadas e coradas utilizando-se diferentes concentrações de um detergente (TX-100; 0,5% ou 1%) e de iodeto de propídeo (IP; 50 µg/mL ou 100 µg/mL) e depois disso, incubadas durante a noite em uma solução contendo diferentes fixadores (etanol, metanol, paraformaldeído – PFA1% ou 4%) e bisbenzimidida. Para a avaliação da qualidade de coloração e contagem diferencial dos núcleos, os blastocistos foram montados em lâminas de vidro e analisados em um microscópio de epifluorescência. O escore de qualidade de coloração foi significativamente diferente ($p < 0,05$) entre todas as soluções fixadoras, sendo maior para o etanol, seguido pelo metanol, PFA1% e PFA4%. Mudanças da concentração do IP e o uso de diferentes soluções de fixação revelaram efeitos significativos na contagem de células da massa celular interna (MCI) e na

razão MCI/trofectoderma (TE). Concentrações diferentes do detergente utilizado para a permeabilização celular apresentaram efeitos significativos sobre a contagem de células TE e razão MCI/TE. Concluímos que o protocolo que utiliza TX-100 1% para a permeabilização celular, 50 µg/mL de IP para coloração das células TE e etanol como solução de fixação representa o método mais eficiente para a coloração diferencial e contagem das células das linhagens celulares do embrião no estágio de blastocisto. No segundo projeto que compõe esta, o objetivo foi avaliar os efeitos da exposição pré e/ou pós-natal ao ar ambiente sobre a fertilização, desenvolvimento embrionário e segregação das linhagens celulares em blastocistos pré-implantacionais, utilizando o modelo de FIV de camundongo. Fêmeas de camundongo com idade de seis semanas tiveram a ovulação estimulada e foram expostas no período pré- e/ou pós-natal ao ar filtrado (AF-AF), ar filtrado – ar ambiente (AF-AA) ou ar ambiente – ar ambiente (AA-AA) em câmaras de exposição 24 horas por dia, sete dias na semana, durante nove semanas. Os pontos de avaliação reprodutivos analisados incluíram a duração da gestação, tamanho e peso da prole, índice de nascidos vivos, razão sexual, resposta ovariana à estimulação, taxa de fertilização, desenvolvimento embrionário, taxas de formação e de eclosão dos blastocistos, contagem celular total e proporção da alocação celular à MCI e TE. A duração da gestação, tamanho e peso da prole, índice de nascidos vivos e razão sexual foram similares nos diferentes grupos de exposição. A resposta ovariana não foi afetada pelo protocolo de exposição. Um efeito multivariável para a exposição pré e/ou pós-natal ao material particulado fino ambiente sobre a FIV, o desenvolvimento embrionário e a coloração diferencial dos blastocistos foi observado. A contagem celular na MCI e a razão MCI/TE dos blastocistos produzidos no protocolo AF-AF foram significativamente maiores do que aquelas em blastocistos produzidos nos protocolos FA-AA e AA-AA. Nenhuma diferença na contagem celular total foi observada. Baseando-se nessas observações, nosso estudo sugere que a exposição ao material particulado fino presente no ar ambiente de um grande centro urbano pode afetar negativamente a saúde reprodutiva feminina através da alteração da especificação das linhagens celulares do embrião no estágio de blastocisto. Finalmente, o propósito do terceiro projeto que compõe esta tese foi de avaliar os efeitos da exposição pré e/ou pós-natal ao ar ambiente no final da vida reprodutiva sobre a fertilização, desenvolvimento embrionário e segregação das linhagens celulares em blastocistos pré-implantacionais, utilizando o modelo de FIV de camundongo. Fêmeas de camundongo com idade de cinco meses tiveram a ovulação estimulada e foram expostas no período pré e/ou pós-natal ao ar filtrado (AF-AF), ar filtrado – ar ambiente (AF-AA) ou ar ambiente – ar ambiente (AA-AA) em câmaras de exposição 24 horas por dia, sete dias na

semana, durante seis meses. Os pontos de avaliação reprodutivos foram os mesmos que aqueles utilizados no segundo projeto. A duração da gestação, tamanho e peso da prole, índice de nascidos vivos e razão sexual foram similares nos diferentes grupos de exposição. A resposta ovariana não foi afetada pelo protocolo de exposição. Um efeito multivariável para a exposição pré e/ou pós-natal ao material particulado fino ambiente sobre coloração diferencial dos blastocistos, mas não sobre a FIV e o desenvolvimento embrionário, foi observado. A contagem celular na MCI e a razão MCI/TE dos blastocistos produzidos no protocolo AF-AF foram significativamente maiores do que aquelas em blastocistos produzidos nos protocolos FA-AA e AA-AA. A contagem celular do TE dos blastocistos produzidos no protocolo FA-FA foi significativamente menor do que aquela em blastocistos produzidos nos protocolos FA-AA e AA-AA. A contagem celular total foi similar entre os grupos. Nosso estudo sugere que a exposição à poluição ambiental particulada de um grande centro urbano não altera a função ovariana, mas pode afetar negativamente a saúde reprodutiva feminina no período final do menacme, através da alteração da especificação das linhagens celulares do embrião no estágio de blastocisto.

Descritores: poluição do ar; material particulado; fertilização *in vitro*; desenvolvimento embrionário; blastocisto; massa celular interna do blastocisto; coloração e rotulagem; reprodução; camundongos.

SUMMARY

Maluf, M. Effects of chronic exposure to particulate air pollution on *in vitro* preimplantation embryo development in mice [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 181p.

A thematic research project to evaluate the health effects of acute/chronic exposure to ambient air in a large urban center was developed at the Air Pollution Laboratory in the Department of Pathology at the University of São Paulo School of Medicine. Within this project a specific research line was committed to the study of the effects of this exposure on female reproductive health. Evidence from epidemiological and experimental studies implied environmental factors as possible contributors to human infertility and poor obstetric outcome. However, very few studies evaluating a possible effect of exposure to particulate air pollution on female reproductive health have been conducted so far. Thus, the aim of the projects in my research line was to provide data that could show the possible effects of chronic exposure to particulate air pollution on ovarian function and early embryo development. The objective of the first project was to assess different methodologies used in cell lineage differential staining of the blastocyst, a method for more accurate evaluation of its quality and normality. Cells of zona-intact mouse blastocysts obtained from *in vitro* fertilization (IVF) were permeabilized and stained using different concentrations of a detergent (TX-100; 0.5% or 1%) and propidium iodide (PI; 50 µg/mL or 100 µg/mL) followed by overnight incubation in a solution containing different fixatives (ethanol, methanol, paraformaldehyde - PFA 1% or 4%) and bisbenzimidazole. To evaluate the staining quality and count the nuclei differentially, blastocysts were mounted and viewed using epifluorescence microscopy. Staining quality scores were significantly different ($P < 0.05$) among all fixative solutions with the highest for ethanol followed by methanol, PFA1%, and PFA4%. Changes in PI concentration and use of different fixative solutions revealed significant effects on inner cell mass (ICM) cell count and ICM/trophoblast (TE) ratio. Different concentrations of the detergent used for cell permeabilization showed significant effects on TE cell counts and ICM/TE ratio. I concluded that the protocol using 1% TX-100 for cell permeabilization, 50 µg/mL of PI for TE cell staining, and ethanol as a fixative solution is the most efficient method for cell lineage differential staining and counting at the blastocyst stage. In the second project the objective was to evaluate the effects of pre- and/or postnatal exposure to ambient air on fertilization, embryo

development, and cell lineage segregation in preimplantation blastocysts using the IVF mouse model. Six-week old superovulated mice were pre- and/or postnatally exposed to filtered air (FA-FA), filtered-ambient air (FA-AA), or ambient air (AA-AA) in exposure chambers 24/7 for nine weeks. Reproductive endpoints evaluated included gestation length, litter size, litter birth weight, live birth index, sex ratio, ovarian response to superovulation, fertilization rate, embryo development, blastocyst and hatching rates, total cell count, and proportion of cell allocation to ICM and TE. Gestation length, litter size, litter birth weight, live birth index, and sex ratio were similar among exposure groups. Ovarian response was not affected by the exposure protocol. A multivariate effect for pre- and/or postnatal exposure to ambient fine particulate matter on IVF, embryo development, and blastocyst differential staining was found. Cell counts in ICM and ICM/TE ratios in blastocysts produced in the FA-FA protocol were significantly higher than in blastocysts produced in FA-AA and AA-AA protocols. No difference in the total cell count was observed. Based on these observations the study suggests that exposure to ambient fine particulate matter in a large urban center may negatively affect female reproductive health by disrupting the lineage specification at the blastocyst stage. Finally, the purpose of the third project was to evaluate the effects of pre- and/or postnatal exposure to particulate air pollution on fertilization, embryo development, and cell lineage segregation in preimplantation blastocysts during the late-life reproductive period using the IVF mouse model. Five-month-old superovulated mice were pre- and/or postnatally exposed to filtered air (FA-FA), filtered-ambient air (FA-AA), or ambient air (AA-AA) in exposure chambers 24/7 during six months. Reproductive endpoints were the same as the ones selected for the second project. Gestation length, litter size, litter birth weight, live birth index, and sex ratio were similar among exposure groups. Ovarian response was not affected by the exposure protocol. A multivariate effect for pre- and/or postnatal exposure to ambient air on blastocyst differential staining but not on IVF and embryo development was found. Cell counts in ICM and ICM/TE ratios in blastocysts produced in the FA-FA protocol were significantly higher than in blastocysts produced in FA-AA and AA-AA protocols. Cell counts in TE cells in blastocysts produced in the FA-FA protocol were significantly lower than in blastocysts produced in FA-AA and AA-AA protocols. The total cell count was similar among groups. This study suggests that exposure to particulate air pollution in a large urban center has no effect on ovarian function but may negatively affect female reproductive health in the late-life period by disrupting the lineage specification at the blastocyst stage.

Descriptors: air pollution; particulate matter; fertilization *in vitro*; embryonic development; blastocyst; blastocyst inner cell mass; staining and labeling; reproduction; mice.

1. INTRODUÇÃO

A motivação para o nosso retorno, meu e do Paulo M. Perin, à vida universitária com o objetivo de obter o título de doutora em ciências, após um período de duas décadas de dedicação exclusiva à prática clínica bem sucedida em nossa especialidade, não ocorreu devido a um evento marcante em nossas vidas, mas sim resultou de uma série de fatores até então considerados isolados que conspiraram para esta volta. A escolha de um estudo científico desenvolvido em nosso laboratório de fertilização *in vitro* e transferência de embriões (FIVETE) como um dos dez candidatos selecionados para concorrer ao prêmio geral do 59º Congresso Anual da Sociedade Americana de Medicina (ASRM) em 2003 foi um destes fatores (1). O resultado de nossas discussões filosóficas sobre o que fazer com o tempo ocioso que estaria presente no final de nossa carreira clínica certamente foi outro ponto importante. No início do ano seguinte, uma conversa com a médica responsável pela divisão de medicina fetal da nossa clínica sobre a sua volta ao ambiente universitário após vários anos de afastamento finalmente despertou um desejo que permaneceu latente após nos fecharem as portas para o acesso à carreira acadêmica vinte anos atrás.

Decidimos então que deveríamos desenvolver os projetos de pesquisa em uma área completamente distinta da ginecologia e da obstetrícia, nossas especialidades, objetivando a mudança radical e a expansão de nossa base

de conhecimentos a partir deste momento. Tivemos então a feliz oportunidade de encontrar no Laboratório de Poluição Atmosférica Ambiental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob a chefia do Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, não somente uma linha de pesquisa voltada aos efeitos da poluição ambiental no mecanismo reprodutivo, incluindo todas as condições necessárias para a elaboração e execução dos projetos, mas também sua visão inovadora, concedendo-nos uma liberdade intelectual ímpar e aproveitando nossos conhecimentos clínicos e laboratoriais sobre esta área, adquiridos ao longo de nossa vida profissional, para transpor os resultados das pesquisas experimentais à arena clínica.

Esta visão está diretamente alinhada ao posicionamento de órgãos governamentais americanos como o *National Institutes of Health* (NIH) e o *National Institute of Environmental Health Sciences* (NIEHS) com relação ao papel do cientista clínico na identificação de oportunidades da pesquisa biomédica com probabilidade de causar um impacto elevado na saúde humana, uma vez que tal pesquisador tem a habilidade única de focar sua pesquisa em questões científicas que são clinicamente relevantes. Para esses órgãos, o cientista clínico tem um papel fundamental no fluxo bidirecional da informação entre as pesquisas básica e clínica, integrando o avanço do conhecimento sobre os sistemas biológicos às novas ferramentas disponíveis (genômica, proteômica, metabolômica, modelos animais transgênicos, biologia estrutural, novas tecnologias de imagem,

bioinformática) para aplicação tanto na pesquisa em laboratório como na investigação clínica (2, 3).

1.1. Linhas de pesquisa desenvolvidas

Nossa integração e interação complementar no trabalho, associada ao amplo conhecimento sobre a fisiologia e fisiopatologia reprodutivas, bem como a experiência laboratorial na fertilização e desenvolvimento embrionário pré-implantacional *in vitro*, apontaram para a necessidade de um modelo experimental único, no qual as ferramentas desenvolvidas especificamente para esse fim pudessem atender de maneira adequada, porém independente, as duas linhas de pesquisa e os recursos disponíveis usados de modo racionalizado. A linha de pesquisa do Paulo envolveu o estabelecimento de um modelo animal de fertilização *in vitro* (FIV) e cultivo de embriões até o estágio de blastocisto utilizando fêmeas de camundongo, a avaliação dos efeitos da exposição aguda de fêmeas de camundongo ao material particulado emitido por motor a diesel sobre a fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro* e, transpondo estes conceitos para a arena clínica, um estudo epidemiológico avaliando os efeitos da exposição pré-concepcional à poluição ambiental sobre o resultado dos ciclos de tratamento de mulheres inférteis submetidas à FIVETE.

Os projetos da minha linha de pesquisa incluíram a seleção e padronização do protocolo mais apropriado para a coloração diferencial das duas primeiras linhagens celulares dos blastocistos de fêmeas de camundongo produzidos através de FIV, a avaliação dos efeitos da

exposição pré e/ou pós-natal de fêmeas de camundongo no início da vida reprodutiva ao material particulado (MP) presente no ar ambiente de um grande centro urbano sobre a fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro* e, finalmente, um protocolo similar ao anterior, porém utilizando fêmeas de camundongo no final de sua vida reprodutiva.

1.2. Poluição Ambiental e Saúde

Os primeiros dados associando os efeitos negativos da poluição ambiental sobre a saúde surgiram entre as décadas de 30 e 50 do século passado, tendo como fonte o aumento abrupto das taxas de mortalidade observado durante elevações extremas dos níveis de poluição urbana (Vale de Meuse, Bélgica, 1930; cidade de Donora, Pensilvânia, Estados Unidos da América – EUA, 1948; cidade de Poza Rico, México, 1950; Londres, Inglaterra, 1952) (4). Posteriormente, estudos epidemiológicos demonstraram de maneira dramática que níveis elevados de poluição atmosférica estavam diretamente associados aos episódios de aumento de morbidade e de mortalidade de origem cardiovascular (5-7). Essas observações levaram as agências ambientais de vários países a estabelecer políticas de controle da qualidade do ar nos centros urbanos que resultaram em uma redução significativa da poluição ambiental nesses centros, eliminando o risco de períodos de poluição ambiental elevada.

Mais recentemente, entre 1989 e 1995, estudos independentes começaram a apresentar dados sugerindo que níveis inesperadamente baixos de poluição ambiental particulada poderiam determinar efeitos adversos à saúde humana (8-10). Pesquisas posteriores reforçaram a sugestão de que os níveis de poluição que são comumente observados em vários centros urbanos representam um fator de risco importante para esses

efeitos adversos (11, 12). Embora a maioria dessas pesquisas tivesse como foco o efeito do MP sobre o sistema respiratório, evidências crescentes indicam que o MP representaria também um fator de risco para outros problemas de saúde, tais como doenças cardiovasculares (13, 14), carcinogênese (15, 16), processos alérgicos (17), doenças infecciosas (18) e doenças endócrinas (19).

Outro aspecto relevante dos efeitos adversos do MP sobre a saúde está ligado ao padrão de exposição da população a esse poluente. A exposição aguda poderia exacerbar doenças pré-existentes, aumentando a sintomatologia, a necessidade de atendimento médico e o risco de morte. Por outro lado, a exposição crônica ao MP aumentaria os riscos cumulativos associados às doenças pré-existentes e de óbito (20). Essas observações têm implicações clínicas importantes na identificação de subgrupos populacionais de risco ou susceptibilidade aumentada a esses efeitos. Saldiva et al. (10) demonstraram que esses efeitos eram exacerbados na população idosa quando comparada à adulta em geral. Estudos avaliando os efeitos da exposição à poluição na infância demonstraram que esse grupo etário também é mais vulnerável do que a população geral (21, 22). Evidências recentes apontam as gestantes como um novo grupo de risco, demonstrando que a poluição ambiental está associada a complicações fetais na gestação e no nascimento (23-25).

1.3. Infertilidade Conjugal

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que cerca de 80 milhões de pessoas ao redor do mundo apresentem infertilidade conjugal (26). Para esses casais, angústia, frustração e desespero são conseqüências comuns dessa situação e têm um impacto profundo em suas vidas. Em geral, cerca de 10% a 15% da população em idade reprodutiva apresenta dificuldade para conceber e/ou levar a termo uma gestação. Essa incidência varia de menos de 5% a mais de 30%, de acordo com a população estudada. Embora a infertilidade possa ser causada por inúmeros fatores, estudos epidemiológicos anteriores mostraram que a produção anormal de gametas (oócitos e/ou espermatozóides), os defeitos tubáricos e a endometriose pélvica representam suas causas mais prevalentes (27, 28).

Fatores múltiplos, tais como idade, hereditariedade, estilo de vida, doenças crônicas, infecções do trato reprodutivo e status nutricional podem interagir entre si e comprometer a fertilidade. A idade feminina é o fator isolado mais importante para a concepção espontânea ou assistida, notando-se um declínio gradual da fertilidade que se inicia após os 30 anos e se acentua de maneira significativa após os 35 anos (29). A tendência atual das mulheres do mundo ocidental em retardar a concepção para a quarta década da vida contribuiu de maneira importante para a redução da taxa global de fertilidade evidenciada nas últimas décadas através de

estudos demográficos (30, 31). Por outro lado, dados do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos EUA mostram que a redução da fertilidade aumentou em todas as faixas etárias ao longo das duas últimas décadas, mas esse fato ocorreu de maneira mais acentuada no grupo de mulheres com idade inferior a 25 anos (32). Nesse grupo, em particular, um dado que chama a atenção é justamente o aumento da proporção de pacientes com diagnóstico de esterilidade sem causa aparente (ESCA), uma situação na qual nenhum fator foi encontrado após investigação exaustiva de possíveis causas masculinas e/ou femininas que determinariam a infertilidade deste casal. Os resultados de estudos epidemiológicos e experimentais que demonstram a redução da fertilidade feminina decorrente da exposição a uma gama variada de substâncias químicas associados aos dados apresentados acima sugerem que diferentes fatores ambientais podem afetar negativamente a saúde reprodutiva e a fertilidade.

1.4. Poluição Ambiental e Saúde Reprodutiva

Nos últimos anos, a comunidade científica tem demonstrado um interesse crescente, através da publicação de vários estudos epidemiológicos e experimentais, sobre a possível associação entre fatores ambientais e a saúde reprodutiva humana. Várias evidências de estudos focados na fertilidade masculina e em resultados da gestação mostraram os efeitos negativos de contaminantes ambientais derivados das emissões do tráfego encontradas no ar urbano, incluindo ozônio (O₃), monóxido de carbono (CO), dióxido de enxofre (SO₂), dióxido de nitrogênio (NO₂), benzeno, formaldeído, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP) e MP em suspensão, sobre o mecanismo reprodutivo (24, 25, 33-38).

Com relação à fertilidade masculina, análises temporais demonstraram uma queda da qualidade espermática associada à exposição a fatores ambientais, particularmente à piora dos índices de qualidade do ar (39, 40). Estudos posteriores, apesar de não identificarem uma relação significativa entre a poluição ambiental e parâmetros da produção espermática (concentração total ou de espermatozóides móveis), mostraram uma associação significativa entre a poluição do ar nos meses de inverno e certos indicadores de qualidade espermática, entre eles a morfologia e a aneuploidia espermáticas e a estrutura da cromatina dos espermatozóides (41, 42). Em um estudo recente, Rubes et al. (34) confirmaram a observação

de que a exposição intermitente a níveis relativamente elevados de poluentes não afeta a concentração espermática, mas aumenta significativamente a porcentagem de espermatozóides com fragmentação do DNA, indicando um dano na integridade da cromatina espermática. Esse fato tem implicações clínicas importantes para a fertilidade do ponto de vista populacional, uma vez que altas taxas de fragmentação do DNA (> 30%) estão associadas à infertilidade e ao aumento do risco de abortamento espontâneo (43, 44).

Estudos epidemiológicos sugerem que a exposição materna à poluição ambiental, mesmo ocorrendo durante períodos de níveis relativamente baixos, pode ser correlacionada a inúmeros resultados perinatais adversos, incluindo crescimento intra-uterino retardado (CIUR), óbito fetal intra-uterino, prematuridade, baixo peso fetal no nascimento e defeitos congênitos (23, 24, 33, 45-47). Todos os poluentes que compõem a mistura de poluição do ar – O₃, CO, NO₂, SO₂ e MP com diâmetros aerodinâmicos inferiores a 10 µm (MP₁₀) e 2,5 µm (MP_{2,5}), os quais são medidos rotineiramente nas estações de monitoramento da qualidade do ar, e os HAP – foram ligados aos resultados perinatais adversos observados em diferentes centros urbanos ao redor do mundo (37).

Estudos experimentais recentes procurando possíveis mecanismos de ação dos poluentes ambientais sobre a saúde reprodutiva focados nas interações entre os genes e o meio ambiente demonstraram um aumento

das taxas de mutação da linhagem germinativa de camundongos expostos ao ar poluído, especialmente ao MP (48-50). Nesses estudos, os autores sugerem os HAP, o MP ou metais pesados como grupos provavelmente responsáveis pelas elevadas taxas de mutação da linhagem germinativa nos animais expostos. Teoricamente, o dano elevado do DNA causado pela exposição à poluição particulada determinaria uma regulação positiva das DNA metiltransferases (DNMTs), resultando em hipermetilação ao longo do tempo. Um aumento da metilação do DNA de gametas poderia causar problemas potenciais para a prole devido à alteração da reprogramação epigenética do oócito fertilizado (50). Contudo, as implicações do aumento dessas taxas de mutação sobre a saúde reprodutiva dos animais e da população ainda são desconhecidas.

O grau de evidência que implica um ou mais poluentes ao evento perinatal adverso é variável. Os indícios sugerem causalidade entre poluição ambiental e baixo peso fetal no nascimento, embora pesquisas adicionais sejam necessárias. Para o parto prematuro e CIUR, os dados ainda são insuficientes para estabelecer uma causalidade, mas os resultados apresentados justificam a realização de novos estudos. Por outro lado, investigações epidemiológicas moleculares sugerem possíveis mecanismos biológicos nos resultados perinatais adversos, reforçando o ponto de vista que a relação entre a poluição e esses resultados seja genuína (25). Considerando-se a exposição a um determinado poluente específico, o MP encontra-se fortemente correlacionado aos casos de óbito fetal intra-uterino,

e os HAP parecem estar ligados ao CIUR, porém as evidências existentes não possibilitam uma identificação precisa dos diferentes poluentes e da janela de exposição que poderiam estar associados aos resultados perinatais adversos (25). Finalmente, várias questões envolvidas no desenho e metodologia dos diferentes estudos realizados até hoje, entre elas, a seleção e análise dos fatores de confusão (idade materna, forma de concepção, nível socioeconômico, estilo de vida, estado nutricional, etc.), o período de exposição durante a gestação e a definição do nível de exposição aos poluentes (p.ex., uso de uma escala contínua ou de quartis para a definição das categorias de exposição), tornam a interpretação dos resultados obtidos e sua comparação com outros estudos problemas potenciais na avaliação dos efeitos da poluição ambiental sobre a gestação.

Por outro lado, um número limitado de estudos tentando correlacionar os efeitos da exposição à poluição ambiental sobre a fertilidade feminina foi realizado até o presente (38, 48-52). Essa limitação pode resultar da dificuldade de se estabelecer uma clara correlação entre as emissões do tráfego e o comprometimento da fertilidade feminina devido à multiplicidade de fatores envolvidos não somente na competência reprodutiva (idade, ambiente hormonal, estado nutricional, patência do trato reprodutivo, reserva ovariana, hereditariedade, polimorfismo genético e comportamento), mas também nos desafios metodológicos encontrados no laboratório para medir e determinar essa correlação. De fato, Mendola et al. (53) realizaram recentemente uma extensa revisão da literatura procurando identificar

artigos científicos publicados entre os anos de 1999 e 2007 que estabelecessem uma possível ligação entre a exposição a contaminantes ambientais e a fertilidade e saúde reprodutiva feminina. Apesar de haver uma grande quantidade de literatura devotada aos efeitos de poluentes ambientais sobre a fertilidade e fecundidade feminina, apenas um artigo citado correlaciona a poluição do ar ambiente à redução da fertilidade (51).

Em seu estudo, Mohallen et al. (51) avaliaram os efeitos da exposição crônica à poluição ambiental de um grande centro urbano sobre a fertilidade de fêmeas de camundongo da linhagem Balb/c. A análise dos pontos de avaliação reprodutiva revelou uma redução significativa no número de fetos viáveis, um aumento do número de falhas de implantação e uma discreta redução da relação macho / fêmea da prole no grupo exposto à poluição. O número de gestações e de mortes fetais e os pesos fetais e placentários não mostraram diferenças entre os grupos. Os autores concluíram que, embora não fosse possível identificar os fatores envolvidos na patogênese da redução da fertilidade promovida pela exposição à poluição ambiental devido ao desenho do estudo, os achados demonstraram que a saúde reprodutiva feminina seria um alvo aos poluentes ambientais.

Posteriormente, Silva et al. (38, 52) realizaram dois estudos tendo como objetivo identificar o período crítico da gestação no qual a exposição materna aos efeitos adversos da poluição afetaria o desenvolvimento fetal, utilizando o mesmo modelo murino empregado no estudo anterior. Os

autores observaram inicialmente um aumento significativo das taxas de abortamento em fêmeas expostas à poluição ambiental durante a primeira semana de gestação, um período crítico para a implantação embrionária e organogênese fetal (52). No segundo experimento, os autores observaram que a exposição das fêmeas ao ar poluído durante a primeira semana de gestação reduziu de maneira significativa o peso fetal, quando comparada à exposição apenas na segunda e/ou terceira semanas da gestação. Com relação ao peso placentário, observou-se que, ao contrário do peso fetal, este foi reduzido de maneira significativa em cada uma das fases de exposição durante a gestação. Esse dado indica não haver um período específico de maior susceptibilidade placentária e sugere uma sensibilidade maior desse tecido aos efeitos adversos da poluição ambiental (38).

1.5. Desafios

A exposição a um número cada vez maior de substâncias químicas lançadas no meio ambiente representa hoje uma fonte considerável de preocupação pública com relação ao papel que os poluentes ambientais têm na saúde humana, em particular na saúde reprodutiva. A exposição a esses poluentes, particularmente durante os períodos críticos do desenvolvimento (pré-concepcional e gestacional), pode ter um efeito profundo tanto no desenvolvimento como na função do sistema reprodutor, comprometendo a saúde reprodutiva ao longo de toda a vida, incluindo a concepção, a fertilidade, a capacidade de engravidar e de manter a gestação, a infância, a adolescência e a idade adulta. Paralelamente, essa exposição pode alterar o comportamento e a resposta imune, e certamente desencadear o desenvolvimento de doenças como a endometriose e o câncer. Contudo, tais efeitos dependem não somente da via de exposição e da dose, mas também da susceptibilidade individual à poluição. Fatores como a idade, o sexo e o genótipo de uma pessoa têm um papel tão grande na susceptibilidade a um agente poluente específico a ponto de modificar o seu efeito, determinando ou não o aparecimento da alteração (anormalidade anatômica, doença, etc.). Como exemplo a susceptibilidade específica observada nos extremos da vida pode ser citada. Crianças e idosos têm comportamento, metabolismo e resposta distintos aos agentes poluentes quando comparados à população

adulta em geral, tornando-os grupos de risco maior aos efeitos da exposição aos poluentes ambientais.

Os dados de exposição representam a ligação fundamental entre os fatores ambientais de risco e suas conseqüências sobre a saúde. Contudo, o principal desafio dos estudos epidemiológicos é justamente a dificuldade para a aquisição desses dados devido a falhas na coleta ou a problemas na reconstrução da exposição passada. Os dados sobre a exposição individual raramente estão disponíveis, fato este que pode ocasionar erros de classificação à exposição. Fatores individuais que modificam o padrão de exposição, tais como idade, raça, sexo, período e localização em relação à fonte de risco, comportamento e genética de uma população, impedem a generalização dos resultados obtidos (54). Essa falta de dados de exposição complica ainda mais esta questão, pois o nível de exposição também influencia os pontos de avaliação da saúde. A exposição a níveis elevados de poluentes ambientais causa efeitos na saúde em um curto espaço de tempo e freqüentemente é reportada na literatura científica. Por outro lado, a exposição crônica a níveis relativamente baixos de poluentes representa um grande desafio para os pesquisadores, uma vez que os efeitos na saúde são desconhecidos ou não observados por anos ou décadas, podem resultar de repetidas exposições ao longo do tempo, podem ocorrer somente após a interação simultânea ou seqüencial de múltiplos agentes ou podem afetar apenas pequenos grupos populacionais susceptíveis (54).

Em nossa vida diária estamos expostos de maneira inevitável e involuntária a uma complexa mistura de substâncias químicas de difícil caracterização, cuja qualidade e quantidade mudaram dramaticamente nos últimos três séculos devido ao processo mundial de industrialização. A identificação e medida de cada uma dessas substâncias no laboratório, a determinação do momento, do grau e do risco determinado por essa exposição e, finalmente, o estabelecimento de uma correlação entre essa exposição e o seu efeito sobre a saúde humana certamente representam uma área do conhecimento de complexidade elevada que requer um elevado volume de pesquisas.

De fato, o grande número de estudos relacionados a essa área demonstra um interesse substancial por parte dos pesquisadores e de agências governamentais de financiamento em pesquisas envolvendo a contaminação ambiental e seus efeitos sobre a saúde reprodutiva. Contudo, a análise crítica da literatura científica relacionada a esse tema que está atualmente disponível ressalta dois conjuntos distintos e importantes de limitações desses estudos, ou seja, aquelas relacionadas ao desenho e metodologia empregadas e aquelas relacionadas à interpretação e análise estatística dos dados obtidos.

Com relação ao primeiro grupo, vários estudos são focados na análise da exposição a um único agente, o que poderia subestimar o risco real, uma vez que alguns desses agentes poderiam ter um efeito cumulativo ou

mesmo aditivo com outras substâncias, não refletindo deste modo a situação observada no “mundo real” para a poluição ambiental, caracterizada pela complexa interação entre inúmeras variáveis. A maioria dos estudos é de natureza retrospectiva e transversal e, por vezes, utiliza dados coletados para outras pesquisas não relacionadas, limitando a análise ou validação dos resultados devido à falta de informações específicas sobre o período de exposição ou fatores de confusão. Esses fatos reduzem de maneira significativa o valor desses estudos, pois a identificação precisa da janela e dose de exposição (muitas vezes não disponíveis neste tipo de estudo), a avaliação adequada dos efeitos no desenvolvimento e o estabelecimento dos fatores de susceptibilidade representam os pontos críticos para a interpretação dos resultados nesta área. Com relação aos períodos críticos de susceptibilidade à exposição aos fatores ambientais, grande parte dos estudos concentra-se na avaliação dos efeitos dessa exposição durante os períodos pré e pós-natal, negligenciando possíveis efeitos que resultariam da exposição pré-concepcional, pois esta poderia em princípio ter um impacto profundo na saúde fetal (45, 55).

Muitos estudos baseiam-se em médias dos níveis de diferentes poluentes obtidos através da coleta de dados pelas estações de monitoramento da poluição ambiental distribuídas em uma grande área de um centro urbano. A extrapolação desses dados gerais ou mesmo regionais para a determinação da exposição individual pode ser problemática. Outro ponto importante da medida dos poluentes reside no fato de que nem

sempre todos os poluentes em questão são medidos em todas as estações de monitoramento ou mesmo todos os dias, restringindo assim o tamanho da amostra da população estudada e introduzindo um viés na análise dos resultados devido à regionalização da coleta de dados. Adicionalmente, a própria quantificação do poluente em tecidos humanos, a qual representa uma etapa fundamental para a caracterização desse processo, não é capaz de associar a evidência ao efeito adverso. Evidências recentes sugerem que exposição a poluentes ambientais pode alterar a reprogramação epigenética dos gametas (50) ou a penetrância gênica (56), efeitos estes que poderiam ser transmitidos a gerações futuras, indicando que o período crítico de exposição ocorreu durante a vida reprodutiva dos antepassados e não na geração atual, aumentando ainda mais a possibilidade de fatores de confusão. Frente a essas limitações e à necessidade de identificar a correlação entre a exposição e os efeitos adversos à saúde, Foster (57) propõe que um peso maior deva ser atribuído aos dados gerados em estudos experimentais utilizando modelos animais, apesar de suas limitações intrínsecas, pois além de fornecerem informações sobre os efeitos de um determinado poluente, esses modelos auxiliam na identificação de prováveis mecanismos de ação.

No segundo grupo, um dos principais pontos para a interpretação dos dados de estudos sobre os efeitos da poluição ambiental na saúde reprodutiva humana é representado pela necessidade da utilização de métodos estatísticos específicos capazes de acomodar a natureza complexa

e inter-relacionada da estrutura de dados. Devido à grande quantidade de dados, análises comparativas múltiplas poderiam introduzir um erro aleatório, pois quanto maior o número de comparações realizadas, maior seria a probabilidade de encontrar algumas “estatisticamente significativas”. Esse fato torna-se mais evidente em estudos nos quais se avalia a exposição a diferentes poluentes em períodos temporais distintos. A introdução de viés na análise pode ocorrer também quando esforços são realizados para separar os efeitos de concentrações de poluentes diferentes que são mutuamente correlacionados sobre os períodos distintos de exposição.

A seleção dos pontos de avaliação primários e secundários ou dos resultados nesses estudos também tem um papel fundamental na interpretação dos dados, pois aqueles que utilizam modelos que incluem múltiplos poluentes devem levar em conta que cada poluente pode apresentar não somente um efeito distinto em cada um dos pontos de avaliação e/ou resultado, mas também apresentar efeito sinérgico com outro(s) poluente(s), modificando completamente o seu efeito sobre este(s) ponto(s) ou resultado(s). Outro aspecto relevante desses estudos é representado pela identificação e controle dos fatores de confusão, pois na investigação dos efeitos da poluição ambiental sobre a saúde, a associação entre o efeito e o fator de risco (poluição) requer mais do que a mera observação das flutuações entre os dois fatores. Fatores de confusão que estão associados tanto ao resultado sobre a saúde como à exposição,

quando não controlados, limitam significativamente a atribuição do efeito de um determinado poluente sobre a saúde. Entre estes fatores incluem-se idade, sexo, raça, estilo de vida (dieta, tabagismo, consumo de álcool), nível socioeconômico, sazonalidade, entre outros. Em estudos epidemiológicos o controle desses fatores não é possível devido à própria natureza do estudo, mas estes devem ser observados, mensurados e incluídos na análise estatística como co-variáveis.

Apesar das limitações apresentadas acima, as quais tornam o desafio de estabelecer uma relação causal entre a exposição à poluição ambiental e o comprometimento da saúde reprodutiva feminina ainda maior, particularmente em estudos epidemiológicos, tive a oportunidade de identificar a direção que minha linha de pesquisa deveria seguir e de estabelecer as diretrizes necessárias para o avanço do conhecimento nesta área, baseando-me nos resultados de experimentos prévios realizados no Laboratório de Poluição Atmosférica Ambiental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo que apontavam para a redução da fertilidade decorrente da exposição ao ar ambiente poluído (38, 51, 52) e na escassez da literatura científica sobre esta questão. As ações prioritárias para a pesquisa foram identificadas em duas grandes áreas: a) Modelo animal – seleção e desenvolvimento de metodologias e, b) Desenho experimental – controle de exposição, identificação e controle dos fatores de confusão e escolha criteriosa dos pontos de avaliação.

Uma vez estabelecido o modelo animal para a obtenção sistemática e confiável de um grande número de blastocistos a partir da fertilização *in vitro* de oócitos (58), o primeiro projeto da minha linha de pesquisa teve como foco o desenvolvimento de uma metodologia para a coloração diferencial das duas primeiras linhagens celulares do blastocisto, cuja razão está diretamente relacionada ao potencial de implantação e de desenvolvimento fetal (59-61), que fosse de fácil reprodução e mantivesse um padrão consistente nos resultados obtidos, pois como os outros projetos tinham como princípio a utilização de um modelo de exposição à poluição ambiental capaz de reproduzir uma situação encontrada no “mundo real”, não teria a possibilidade de duplicar os experimentos, pois esta seria única.

A coloração diferencial da primeira segregação de linhagens celulares no blastocisto, empregada para a avaliação da qualidade embrionária, ainda se baseia em uma técnica descrita em 1984 por Handyside & Hunter (62) e é utilizada na maioria dos experimentos até o presente. Nessa técnica, após a remoção completa da zona pelúcida do blastocisto, as células do trofoectoderma (TE) são marcadas com o fluorocromo iodeto de propídeo (IP) após sua permeabilização utilizando a lise seletiva com complemento mediada por anticorpos e o fluorocromo bisbenzimidaz. Contudo, sua eficiência depende de vários fatores que incluem o nível de expressão antigênica, a estabilidade química e especificidade do anticorpo e a reprodutibilidade dos parâmetros de incubação, o que a torna pouco prática

e de difícil reprodução. Recentemente, foi descrita a modificação de uma técnica direta, quimicamente definida e livre da utilização de anticorpos, envolvendo a permeabilização das células TE após a breve exposição dos blastocistos ainda no interior de suas zonas pelúcidas a um detergente não iônico contendo IP, seguida pela incubação noturna em uma solução fixadora contendo bisbenzimidazina (63). Os principais benefícios dessa técnica em relação à anterior são representados por sua simplicidade e rapidez de execução, seu baixo custo e sua consistência nos resultados da coloração diferencial. Contudo, apesar de extremamente atraente do ponto de vista de execução devido à sua aparente facilidade, a falta de outros estudos reproduzindo essa metodologia levou-me à elaboração do primeiro projeto da minha linha de pesquisa para esclarecer questões relacionadas à sua reprodutibilidade e otimização, avaliando parâmetros como a exposição dos blastocistos a diferentes concentrações do detergente, a utilização de diferentes concentrações do corante nuclear, bem como, a eficácia de soluções fixadoras distintas. A dificuldade inicial encontrada neste estudo foi transformar a avaliação subjetiva da qualidade da coloração diferencial de cada um dos protocolos utilizados em um processo objetivo de análise que permitiria a utilização de testes estatísticos apropriados para confirmar ou refutar prováveis diferenças encontradas entre os protocolos. Para tanto, desenvolvi um escore específico para a classificação da qualidade da coloração diferencial das duas primeiras linhagens celulares do blastocisto, utilizando a morfologia e coloração nucleares, como critérios de

diferenciação da qualidade, eliminando desta forma a subjetividade da avaliação.

Com relação ao desenho experimental, os principais desafios para os outros dois projetos da minha linha de pesquisa incluíram o controle de exposição, identificação e controle dos fatores de confusão e escolha criteriosa dos pontos de avaliação. Evidências epidemiológicas atuais sugerem que a exposição ao MP correlaciona-se com resultados gestacionais e perinatais adversos (25, 36, 37, 64, 65). Paralelamente, no estudo experimental realizado anteriormente em nosso laboratório, um provável papel do MP na redução da fertilidade foi identificado através da diminuição do tamanho da prole e do aumento da taxa de falhas de implantação (51). Com base nesses dados, resolvi explorar o efeito da exposição pré-natal e pré-concepcional ao MP sobre o desenvolvimento e qualidade dos embriões produzidos através de FIV com o objetivo de identificar prováveis alterações embrionárias que pudessem estar correlacionadas aos eventos adversos observados na gestação. A primeira limitação para os projetos de exposição foi justamente o desenvolvimento de um modelo que permitisse avaliar especificamente os efeitos do MP sobre o desenvolvimento embrionário inicial, sem se afastar do objetivo de simulação da “vida real”, situação essa em que outros poluentes poderiam influenciar o efeito do MP. A solução encontrada para esse problema foi a utilização de um sistema de filtragem do ar que retivesse o $MP_{2,5}$ sem reter os gases

poluentes (CO, SO₂, NO₂), de modo que apenas a concentração do MP_{2,5} fosse significativamente diferente nas duas câmaras de exposição.

A escolha dos camundongos da linhagem Swiss Albino de cruzamento aleatório para a realização dos experimentos ocorreu devido a duas características importantes dessa linhagem: a boa resposta à estimulação ovariana com gonadotrofina eqüina, o que evitaria a utilização de linhagens híbridas, e o polimorfismo genético, o que a torna representativa da diversidade biológica encontrada na espécie humana (66). Contudo, a escolha dessa linhagem introduziu no experimento um fator de confusão representado por padrões distintos de resposta à estimulação ovariana apresentados por certos grupos de camundongos, situação semelhante à observada na espécie humana. O problema da idade, outro importante fator de confusão em estudos reprodutivos, foi resolvido com a realização do mesmo experimento em dois grupos etários distintos (início e final da vida reprodutiva) para a avaliação do efeito da idade na susceptibilidade ao MP_{2,5}.

Por fim, a seleção dos pontos de avaliação, tanto para a identificação de possíveis efeitos da exposição pré-natal ao MP sobre os resultados reprodutivos (duração da gestação, tamanho e razão sexual da prole e índice de nascidos vivos), como sobre a fertilização, desenvolvimento e qualidade dos embriões produzidos através de FIV (número de oócitos recuperados e inseminados, número de zigotos, número de blastocistos e

taxa de eclosão 96 e 120 horas após a inseminação dos oócitos e contagem diferencial e razão das duas linhagens celulares dos blastocistos) possibilitou uma análise detalhada de várias etapas do mecanismo reprodutivo até então não avaliadas nos estudos de exposição à poluição ambiental. Contudo, um possível ponto de falha da avaliação do grau de evolução do desenvolvimento embrionário foi identificado na análise das taxas de eclosão dos blastocistos após 96 e 120 horas de cultivo dos zigotos. Para resolver esse problema, atribuiu-se inicialmente a cada fêmea um escore de eclosão que representava a soma do padrão de eclosão de cada um dos blastocistos dividida pelo número total de blastocistos obtidos 96 e 120 horas após a inseminação dos oócitos. Posteriormente, um escore discriminatório foi desenvolvido através de um modelo matemático com o objetivo de identificar o potencial de desenvolvimento do coorte de blastocistos de cada fêmea. A razão dessa abordagem seria equilibrar o padrão de eclosão e o potencial de desenvolvimento dos blastocistos, visando facilitar a separação de fêmeas com coortes de blastocistos que apresentassem padrões similares de eclosão e potenciais distintos de desenvolvimento.

2. OBJETIVOS

Os objetivos da linha de pesquisa desenvolvida para avaliar os efeitos da exposição crônica ao $MP_{2,5}$ ambiental sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional de fêmeas de camundongo nos extremos da vida reprodutiva são apresentados abaixo de acordo com o seu respectivo projeto:

2.1. Projeto Coloração Diferencial

Título do Projeto: Coloração diferencial das duas primeiras linhagens celulares dos blastocistos de fêmeas de camundongo produzidos através de fertilização *in vitro*.

Objetivo: comparar diferentes metodologias de permeabilização da membrana celular, coloração nuclear e fixação celular para a especificação diferencial das duas primeiras linhagens celulares do blastocisto de camundongo.

2.2. Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Início da Vida Reprodutiva

Título do Projeto: Fertilização *in vitro*, desenvolvimento embrionário e segregação das linhagens celulares de blastocistos pré-implantacionais após a exposição pré e/ou pós-natal de fêmeas de camundongo da linhagem Swiss Albino à poluição ambiental particulada.

Objetivo: Avaliar os potenciais efeitos da exposição pré e/ou pós-natal ao MP_{2,5} sobre a fertilização, desenvolvimento embrionário e segregação das duas primeiras linhagens celulares de blastocistos pré-implantacionais, utilizando o modelo experimental de fertilização *in vitro* em fêmeas de camundongo.

2.3. Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Final da Vida Reprodutiva

Título do Projeto: Fertilização *in vitro*, desenvolvimento embrionário e segregação das linhagens celulares de blastocistos pré-implantacionais após a exposição pré e/ou pós-natal de fêmeas de camundongo da linhagem Swiss Albino com cinco meses de idade à poluição ambiental particulada.

Objetivo: Avaliar os efeitos da exposição pré e/ou pós-natal de fêmeas de camundongo no final da vida reprodutiva ao MP_{2,5} sobre a reprodução, resposta ovariana à estimulação com gonadotrofina eqüina, fertilização, desenvolvimento embrionário e segregação das duas primeiras linhagens celulares de blastocistos pré-implantacionais, utilizando o modelo experimental de fertilização *in vitro* em fêmeas de camundongo, baseando-se na hipótese de que a exposição crônica à poluição ambiental acentuaria o efeito do processo de envelhecimento sobre a reserva ovariana e a qualidade de gametas e/ou embriões.

3. MÉTODOS

As metodologias específicas de cada um dos projetos: 1) Coloração Diferencial; 2) Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Início da Vida Reprodutiva e 3) Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Final da Vida Reprodutiva são encontradas nos Anexos A, B e C, respectivamente.

4. RESULTADOS

Os principais resultados de cada um dos projetos da linha de pesquisa desenvolvida para avaliar os efeitos da exposição crônica ao $MP_{2,5}$ ambiental sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional de fêmeas de camundongo nos extremos da vida reprodutiva são apresentados abaixo:

4.1. Projeto Coloração Diferencial

Neste estudo, foi comparada a qualidade da coloração diferencial das duas primeiras linhagens celulares do blastocisto de acordo com mudanças na concentração do detergente não iônico utilizado para a permeabilização celular (Triton X-100, TX-100; concentrações de 0,5% ou 1%), na concentração do corante de células TE (IP; concentrações de 50 µg/mL ou 100 µg/mL) e no tipo de solução fixadora (etanol, EtOH; metanol, MEtOH; paraformaldeído 1%, PFA1%; paraformaldeído 4%; PFA4%), que resultaram em dezesseis protocolos distintos.

Os resultados mostraram que a qualidade da coloração diferencial das linhagens celulares de blastocistos de camundongo intactos foi afetada de maneira significativa pela solução fixadora, mas não pela variação das concentrações do detergente ou IP. A comparação dos efeitos de cada uma das quatro soluções fixadoras no escore de qualidade da coloração diferencial mostrou que resultados significativamente melhores foram obtidos com a utilização do EtOH como agente fixador. A eficiência do processo de coloração diferencial de acordo com a solução fixadora utilizada foi de 82% para o EtOH, 60% para o MEtOH, 35% para o PFA1% e 8% para o PFA4%.

Por outro lado, embora a qualidade da coloração diferencial das linhagens celulares não tenha sido afetada pelo detergente ou IP, as

mudanças das suas concentrações bem como as interações entre essas mudanças afetaram significativamente as contagens das células da massa celular interna (MCI) e TE. Adicionalmente, a contagem celular diferencial também foi afetada de maneira significativa pela solução fixadora utilizada.

Os resultados deste estudo fornecem evidências sugerindo que o protocolo que utiliza TX-100 na concentração de 1% para a permeabilização celular, IP na concentração de 50 µg/mL para a coloração das células TE e o EtOH como solução fixadora apresenta-se como o método mais eficiente para a coloração diferencial e contagem celular das duas primeiras linhagens de embriões no estágio de blastocisto.

Tabelas e detalhes dos resultados deste estudo são encontrados no Anexo A.

4.2. Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Início da Vida Reprodutiva

O impacto da exposição pré e/ou pós-natal de fêmeas de camundongo no início da vida reprodutiva ao $MP_{2,5}$ presente no ar ambiente sobre a reprodução e o desenvolvimento e qualidade de embriões pré-implantacionais é avaliado neste estudo (Anexo B).

Os dados experimentais fornecem evidências importantes de que a exposição ao $MP_{2,5}$ ambiente de um grande centro urbano causa um distúrbio no padrão de alocação das duas primeiras linhagens celulares do embrião no estágio de blastocisto, caracterizado pela redução do número de células da MCI e da razão MCI/TE sem interferir no seu desenvolvimento. O número total de células dos blastocistos não foi afetado pela exposição, indicando que a segregação celular foi desviada para a linhagem de células TE. Adicionalmente, um padrão similar de especificação das linhagens celulares no estágio de blastocisto observado em embriões originados de fêmeas de camundongo expostas no período pré e/ou pós-natal ao material particulado fino sugere que a exposição pré-natal ao ar ambiente não acentua o distúrbio do padrão de alocação das linhagens celulares do blastocisto, indicando que esse efeito pode ser ligado especificamente à exposição pós-natal.

A resposta ovariana à estimulação com gonadotrofinas foi analisada como uma variável independente devido à variabilidade genética da linhagem de camundongo selecionada, com o objetivo de minimizar sua influência como possível fator de confusão. Os dados obtidos mostraram que o padrão de resposta ovariana não afetou a especificação das linhagens celulares no blastocisto, embora tenha causado um impacto negativo no desenvolvimento embrionário pré-implantacional no grupo de resposta elevada em relação aos grupos de resposta pobre e normal.

As evidências obtidas neste estudo indicam que a exposição ao material particulado fino presente no ar ambiente de um grande centro urbano pode afetar negativamente a saúde reprodutiva feminina através do desequilíbrio do padrão de alocação das duas primeiras linhagens celulares do embrião no estágio de blastocisto. Baseando-se nessa observação e no fato de que uma redução significativa da população de células da MCI é incompatível com um desenvolvimento embrionário normal após a implantação, os resultados deste estudo sugerem que a sensibilidade diferencial das células MCI e TE à poluição ambiental pode contribuir para um resultado reprodutivo adverso. Finalmente, a coloração celular diferencial no estágio de blastocisto poderia ser utilizada como biomarcador para monitorar os efeitos da poluição ambiental sobre a saúde reprodutiva feminina em estudos experimentais.

4.3. Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Final da Vida Reprodutiva

Baseando-se na hipótese de que a exposição crônica à poluição ambiental acentue os efeitos negativos sobre a reserva ovariana e qualidade de gametas e /ou embriões que ocorrem durante o processo natural de envelhecimento, este estudo foi delineado para avaliar os efeitos da exposição pré e/ou pós-natal de fêmeas de camundongo no final da vida reprodutiva à poluição ambiental particulada sobre a procriação, resposta ovariana à estimulação com gonadotrofinas, fertilização, desenvolvimento embrionário e segregação de linhagens celulares em blastocistos pré-implantacionais, utilizando-se o modelo de FIV em camundongos. Os resultados detalhados e tabelas são encontrados no Apêndice C.

Os resultados deste estudo mostram que a exposição crônica pré-concepcional de fêmeas de camundongo ao $MP_{2,5}$ derivado de emissões veiculares através de toda a sua vida reprodutiva reduz a alocação de células à linhagem embrionária sem alterar a contagem celular total dos blastocistos, comprometendo o potencial de implantação e a viabilidade dos embriões e sugerindo um desvio da segregação celular para a linhagem placentária. Adicionalmente, embriões obtidos de fêmeas de camundongo expostas nos períodos pré e/ou pós-natal ao $MP_{2,5}$ ambiente apresentam um padrão similar de distúrbio da especificação das linhagens celulares do

blastocisto, refletindo que este efeito não foi acentuado pela exposição pré-natal e que pode ser especificamente ligado à exposição pós-natal.

Por outro lado, o resultado reprodutivo no nascimento, a resposta ovariana à estimulação com gonadotrofinas ou a fertilização e o potencial de desenvolvimento embrionário *in vitro* não foram afetados em fêmeas de camundongo no final de suas vidas reprodutivas, que foram submetidas à exposição crônica ao MP_{2,5} ambiente. A grande variabilidade inter-individual da resposta ovariana às gonadotrofinas devido às características genéticas da linhagem de camundongo selecionada não afetou a segregação celular em blastocistos ou alterou a susceptibilidade dessas fêmeas de camundongo aos efeitos da exposição ao material MP_{2,5} ambiente sobre a especificação das linhagens celulares no estágio de blastocisto.

Este estudo fornece um suporte adicional às observações prévias de que a exposição crônica ao MP_{2,5} ambiente pode ocasionar um distúrbio do padrão de alocação das duas primeiras linhagens celulares no estágio de blastocisto tanto em fêmeas no início como no final de suas vidas reprodutivas de maneira similar, comprometendo o potencial de implantação e a viabilidade futura dos embriões. A redução específica da população celular da MCI pode contribuir para elucidar o mecanismo pelo qual a exposição à poluição ambiental particulada aumenta as taxas de falhas de implantação e de perda gestacional inicial. Estudos adicionais são necessários para investigar os mecanismos biológicos que associam a

exposição ao $MP_{2,5}$ ambiente e resultado obstétrico adverso, incluindo a viabilidade e desenvolvimento gestacional.

5. DISCUSSÃO

A exposição humana e animal aos poluentes encontrados no meio ambiente sempre ocorreu. Contudo, a partir da segunda metade do século passado, notou-se uma mudança dramática na composição destes poluentes, tornando-a muitas vezes complexa e envolvendo componentes naturais e sintéticos. No início da década de 1990, várias evidências apontavam para uma associação entre a contaminação ambiental e a função reprodutiva alterada em populações selvagens de peixes, anfíbios, répteis e aves (67-71). A preocupação crescente do público com relação ao papel dos poluentes ambientais sobre a saúde humana, em particular a saúde reprodutiva, acentuou-se nos últimos dez anos. Neste período, observou-se um aumento da incidência de infertilidade em todas as faixas etárias, particularmente no grupo etário com idade inferior a 25 anos (32) que, associado à publicação de estudos científicos relacionados, mostrava uma clara evidência de que a exposição pré-concepcional, pré-natal e/ou pós-natal a substâncias químicas ambientais ou terapêuticas afetaria mecanismos específicos do sistema reprodutor masculino e feminino, causando interrupção da gametogênese, alterações anatômicas e funcionais de tecidos ou órgãos reprodutivos e resultado obstétrico adverso (abortamento, CIUR, prematuridade, etc.) (25, 37, 45, 53, 72).

Por outro lado, apesar da natureza universal de distribuição e de exposição ao ar poluído de grandes centros urbanos, identifica-se uma enorme lacuna de conhecimento caracterizada pela falta de informações precisas com relação aos riscos da exposição aguda a altas concentrações ou crônica a baixas concentrações de contaminantes do ar tais como O₃, CO, SO₂, NO₂ e MP, sobre a saúde reprodutiva feminina. De fato, os estudos encontrados na literatura concentram-se nos efeitos da exposição pré-natal à poluição ambiental sobre o desenvolvimento fetal e, até o presente, nenhum estudo avaliou o efeito que a exposição crônica ao ar ambiente tem sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional durante a vida reprodutiva feminina.

Identificando essa lacuna na literatura científica e aproveitando o planejamento estratégico do Laboratório de Poluição Atmosférica Ambiental do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob a chefia do Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, com relação ao estudo dos efeitos da poluição ambiental sobre a saúde humana, tive a oportunidade de introduzir neste laboratório uma linha inédita de pesquisa. Os objetivos dessa linha incluíam a identificação de subgrupos específicos de susceptibilidade aos efeitos da exposição crônica pré-concepcional sobre a fertilização e desenvolvimento embrionário inicial nos extremos da vida reprodutiva e o rastreamento do desenvolvimento embrionário pré-implantacional *in vitro* na busca de alterações que pudessem ser correlacionadas ao resultado gestacional adverso. A

viabilização dos objetivos apresentados deu-se através do desenvolvimento de um modelo animal de estudo (58) e, paralelamente, da identificação e padronização da metodologia capaz de avaliar de maneira objetiva o potencial de implantação e de desenvolvimento fetal dos embriões produzidos nos estudos dos efeitos da poluição ambiental sobre o mecanismo reprodutivo feminino.

No estudo do desenvolvimento da metodologia para a coloração diferencial das duas primeiras linhagens celulares do blastocisto, cujo número absoluto e razão representam importantes marcadores do potencial de implantação e desenvolvimento embrionário gestacional (59-61), nossos dados fornecem evidências sugerindo que o protocolo que utiliza TX-100 na concentração de 1% para a permeabilização celular, IP na concentração de 50 µg/ml para a coloração das células TE e o EtOH como solução fixadora apresenta-se como o método mais eficiente para esta coloração. Estes achados confirmaram os resultados anteriormente apresentados por Thouas et al. (63), que mostraram que a utilização de um protocolo quimicamente definido e de fácil execução apresentava resultados comparáveis àqueles utilizando técnicas mediadas por complemento (62, 73-75), de difícil execução e reproducibilidade, para a coloração celular diferencial dos embriões no estágio de blastocisto.

Por outro lado, a necessidade da identificação de outras soluções fixadoras é ressaltada pelo fato de que certos anticorpos são extremamente

sensíveis a esses fixadores, impedindo assim a associação da coloração diferencial a outras técnicas, tais como citoquímicas ou imunoistoquímicas. A possibilidade de associação dessas técnicas auxiliaria na identificação mais precisa de cada uma das populações celulares, de sua integridade ou mesmo na expressão diferencial de proteínas específicas. Em um estudo recente, Fouladi-Nashta et al. (76) descreveram um método que permitia a utilização concomitante da coloração diferencial para a determinação da razão MCI/TE e o método de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUDP nick end labeling) para a detecção de apoptose celular. Embora esses investigadores tenham utilizado um método similar ao de Thouas et al. (63) para a permeabilização e coloração das células TE, eles trocaram a solução fixadora de etanol para PFA 4%, baseando-se no fato de que os formaldeídos apresentam reação cruzada com proteínas, retendo os componentes celulares em suas localizações originais, ao contrário do que é observado com os alcoóis que induzem quebras no DNA, determinando resultados falso-positivos no método de TUNEL.

Os maus resultados observados para o grupo de PFA 4% em nosso estudo podem estar relacionados à incubação noturna a 4°C, uma vez que Fouladi-Nashta et al. (76) apresentaram bons resultados com esse agente fixador após a incubação em temperatura ambiente por um período de 30 minutos apenas. Essa observação enfatiza a importância da seleção cuidadosa da solução fixadora utilizada para a coloração diferencial dos

blastocistos e indica a necessidade de se estabelecer a melhor metodologia para maximizar a eficiência no estudo experimental.

Baseando-se no fato de que o sucesso e reproducibilidade da coloração diferencial das duas primeiras linhagens celulares do blastocisto não são apenas dependentes do tempo de incubação, mas também da concentração do detergente e do IP utilizados para a permeabilização e coloração das células TE, o objetivo do nosso estudo foi refinar a técnica apresentada por Thouas et al. (63), através da avaliação dos efeitos de diferentes concentrações do detergente e do IP para cada uma das soluções fixadoras na identificação das duas populações celulares (MCI e TE) presentes em blastocistos intactos de camundongo. Os dados obtidos mostraram que a qualidade da coloração diferencial dos blastocistos não foi alterada por modificações das concentrações do detergente e/ou IP, mas diretamente afetada pela solução fixadora utilizada. Por outro lado, um aumento da concentração do detergente e/ou IP apresentou um efeito negativo importante sobre a contagem diferencial das linhagens celulares do blastocisto para todas as soluções fixadoras, exceto o EtOH. Esse efeito negativo foi minimizado nos grupos que utilizaram como agente fixador o MEtOH ou PFA1%, mas não o PFA4%, reduzindo-se as concentrações tanto do detergente como do IP. A redução da concentração do IP para 50 µg/ml, mantendo-se a concentração do detergente em 1% no grupo que utilizou o EtOH como agente fixador, melhorou significativamente a contagem celular diferencial.

Embora não seja possível comparar os números absolutos das células MCI e TE observadas em nosso estudo com aqueles apresentados previamente por Thouas et al. (63) devido à diferença do estágio de desenvolvimento no qual os blastocistos foram corados em cada um dos experimentos, observamos resultados similares para a porcentagem de células da MCI em relação ao número total de células e para a razão MCI/TE no grupo que utilizou o EtOH como agente fixador (26,0% e 27,8%; 0,38 e 0,38, respectivamente). Para o protocolo com a redução específica de 50% na concentração do IP, observamos melhores resultados tanto para a porcentagem de células em relação ao número total de células e para a razão MCI/TE (32,8% e 0,40).

Em resumo, este estudo confirma a observação prévia que sugere a incorporação do IP após a permeabilização das células TE e fixação com EtOH como o protocolo de maior eficiência para a coloração celular diferencial de blastocistos e relata, pela primeira vez, a eficiência dos diferentes agentes fixadores utilizados para essa coloração. Adicionalmente, aponta para a necessidade de identificar soluções fixadoras específicas para cada experimento devido à observação de que a eficiência do processo de coloração varia de acordo com o agente fixador utilizado.

Os principais poluentes encontrados no ar ambiente urbano, entre eles o CO, NO₂, SO₂, benzeno, formaldeído, HAP e MP, podem alterar a

fertilidade humana por meio de efeitos diretos e/ou indiretos nas diferentes vias dos processos celulares, incluindo interferência mitótica, sinalização celular alterada, alterações das fontes energéticas, inibição enzimática, mutações, modificações da expressão gênica, distúrbios na síntese e função do RNA e DNA e morte celular (77) programada ou através da perturbação do funcionamento dos sistemas endócrino e/ou imune (72, 78).

Substâncias químicas capazes de interferir diretamente na função mitocondrial podem afetar negativamente a maturação oocitária, a fertilização e o desenvolvimento embrionário inicial, pois as mitocôndrias têm papéis diferentes no gameta feminino e no embrião em desenvolvimento, que incluem desde a organização do fuso mitótico e segregação cromossômica, regulação do ciclo celular até a compactação, cavitação e eclosão no estágio de blastocisto (79). A redução da capacidade de produção de ATP, necessária para a manutenção celular apropriada, poderia inibir a citocinese e determinar a interrupção da divisão celular e, finalmente, a morte celular, em embriões que seriam incompetentes do ponto de vista de desenvolvimento (80).

Por outro lado, outras substâncias químicas poderiam atuar indiretamente em receptores, causando sua ativação (efeito agonista) ou inativação (efeito antagonista) de maneira inapropriada. Os HAP, substâncias químicas presentes no ar poluído e na fumaça do cigarro, podem ser liberados no meio ambiente como produto de exaustão da

queima de combustível veicular. A ativação dos receptores AhR pela exposição aos HAP induz a expressão do gene Bax, regulador da apoptose celular, determinando a atresia de oócitos e redução da reserva ovariana e, ao menos em parte, poderia estar relacionada ao declínio da resposta ovariana e falência ovariana prematura na população feminina (81-83). Adicionalmente, certas substâncias químicas poderiam atuar como hormônios endógenos, bloqueando ou estimulando de maneira inadequada a atividade hormonal. O MP em suspensão no ar ambiente, com ou sem outros componentes gasosos, pode atuar como um agente disruptor endócrino estrogênico e foi ligado recentemente ao aumento da incidência de cânceres de mama, endométrio e ovário em mulheres, mesmo após a exclusão de fatores de confusão como tabagismo, densidade populacional e fatores relacionados ao uso de hormônios (84).

A seleção do MP, um dos componentes da poluição ambiental, como objeto de estudo para a avaliação dos seus efeitos sobre o mecanismo reprodutivo feminino, baseou-se em dados da literatura que o correlacionam a vários eventos adversos observados na gestação (25, 37) e no fato de que, nos estudos epidemiológicos, ele representaria o melhor marcador ambiental da exposição individual (85). Contudo, a própria natureza da poluição ambiental, representada por uma mistura de substâncias cuja composição depende diretamente das fontes que contribuíram para sua formação, de condições climáticas e geográficas e da interação dessas substâncias entre si, aponta para o grau de complexidade envolvido nos

estudos relacionados aos seus efeitos sobre o mecanismo reprodutivo. Essas características dificultam a identificação dos efeitos isolados de cada um dos poluentes desta mistura difícil e por vezes limitam de maneira importante a interpretação dos resultados, quando a interação entre os diferentes poluentes é eliminada. Câmaras de exposição ao ar ambiente, nas quais a concentração do MP foi o único parâmetro controlado, foram utilizadas para a investigação dos efeitos do MP_{2,5} ambiente sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional, tornando possível um modelo de exposição no qual o MP_{2,5} ambiente poderia ainda interagir com os demais poluentes e produzir, dessa forma, um padrão de exposição similar ao encontrado na “vida real”.

No estudo realizado para avaliar o impacto da exposição ao MP_{2,5} presente no ar de um grande centro urbano sobre a fertilização, desenvolvimento embrionário e segregação das linhagens celulares de blastocistos pré-implantacionais em fêmeas de camundongo no início da vida reprodutiva observou-se que, independentemente do fato da exposição ter ocorrido no período pré e/ou pós-natal, o MP_{2,5} não interfere no desenvolvimento embrionário inicial, mas altera de maneira significativa o padrão de alocação das duas primeiras linhagens celulares dos embriões em estágio de blastocisto, reduzindo o número de células MCI e a razão MCI/TE sem modificar o número total de células. O polimorfismo genético do grupo de camundongos do estudo, traduzido clinicamente pelos diferentes padrões de resposta à estimulação ovariana com gonadotrofinas, não

alterou a especificação das linhagens celulares do blastocisto, sugerindo que não haveria uma susceptibilidade maior de um subgrupo específico aos efeitos do MP_{2,5}.

Em um estudo prévio realizado no nosso laboratório, Mohallen et al. (51) avaliaram os efeitos da exposição crônica à poluição ambiental sobre a fertilidade de fêmeas de camundongo da linhagem Balb/c. A análise dos pontos de avaliação reprodutivos revelou uma redução significativa do número de fetos viáveis e um aumento do número de falhas de implantação, sem contudo afetar o número de gestações, mortes fetais ou peso fetal e placentário. Os autores concluíram que, embora o desenho do estudo não permitisse a identificação dos fatores envolvidos na patogênese da redução da fertilidade, os achados mostraram claramente que a saúde reprodutiva feminina representava um alvo aos poluentes ambientais.

No presente estudo, observamos que o resultado reprodutivo adverso observado em fêmeas de camundongo expostas ao MP_{2,5} presente no ar ambiente no estudo anterior poderia ser explicado por um defeito na especificação das linhagens celulares no blastocisto em vez da alteração do processo de fertilização, do desenvolvimento embrionário inicial e da formação e eclosão dos blastocistos. A formação do blastocisto resulta da diferenciação funcional das células embrionárias em duas linhagens distintas: as células MCI que originam todos os tecidos embrionários e parte das membranas extra-embrionárias e as células TE que contribuem

basicamente para a formação do tecido placentário fetal (86). As duas linhagens celulares, bem como a razão entre elas, têm um papel fundamental para a sobrevivência embrionária e viabilidade fetal e o blastocisto é dotado de mecanismos necessários para o controle da especificação dessas linhagens celulares, que têm uma margem estreita de funcionamento (87).

Estudos experimentais e clínicos mostraram uma relação positiva entre o número e morfologia das células MCI e a taxa de implantação embrionária (59-61). Existem evidências convincentes de que um desequilíbrio da diferenciação das linhagens celulares do blastocisto que ocorria durante o desenvolvimento embrionário inicial poderia comprometer sua evolução pós-implantacional (87, 88). Adicionalmente, devido às diferenças do posicionamento celular e das necessidades metabólicas, as linhagens celulares da MCI e TE apresentam susceptibilidades diferentes aos agentes embriotóxicos e, na maioria das vezes, as células MCI são mais sensíveis ao dano do que as células TE (89).

Baseando-me no achado mais importante do nosso estudo, representado pela redução significativa do número de células MCI e da razão MIC/TE após a exposição crônica ao $MP_{2,5}$ presente no ar ambiente, posso formular a hipótese de que essa redução significativa resultante do desequilíbrio da alocação das células durante a especificação das linhagens celulares no blastocisto poderia representar o mecanismo biológico pelo qual

a poluição ambiente influenciaria a viabilidade da gestação. Contudo, o mecanismo pelo qual o $MP_{2,5}$ causa a redução do número de células MCI e o aumento das células TE ainda é desconhecido e necessita maior investigação.

A regulação molecular da especificação das linhagens celulares no embrião em estágio de blastocisto ainda não é completamente compreendida. Contudo, a diferenciação entre as linhagens de células MCI e TE pode ser feita através da identificação de fatores de transcrição específicos para cada uma das linhagens celulares. A Oct4, uma proteína da família POU dos genes homeobox, e o Nanog, um gene homeobox, têm suas expressões restritas às células MCI após a formação do blastocisto. O Cdx2, um fator de transcrição homeodomain tipo caudal, é expresso especificamente nas células TE do blastocisto. A Oct4 e o Cdx2 regulam entre si suas expressões negativamente possibilitando uma segregação apropriada das linhagens celulares MCI e TE necessária para o desenvolvimento normal do blastocisto (86, 90). Em face às evidências citadas e aos nossos resultados, que mostram uma perturbação da especificação das linhagens celulares do blastocisto, podemos especular que a exposição à poluição ambiental poderia alterar o balanço entre as expressões da Oct4 e do Cdx2 comprometendo a integridade e a função das diferentes linhagens celulares e, no final, a viabilidade embrionária e fetal.

A decisão de analisar os efeitos da exposição pré e/ou pós-natal ao ar ambiente sobre a resposta ovariana baseou-se em estudos clínicos que mostravam que o tabagismo poderia acelerar a depleção folicular levando a uma redução significativa da reserva ovariana e, conseqüentemente, menor resposta à estimulação ovariana mesmo em pacientes mais jovens (91-93). Apesar de os mecanismos envolvidos nos efeitos prejudiciais à saúde reprodutiva causados pelo tabagismo não serem os mesmos daqueles resultantes da exposição à poluição ambiental, eles poderiam compartilhar vias comuns. Nossos resultados mostraram que a distribuição dos diferentes padrões de resposta ovariana à indução com gonadotrofinas não foi afetada pela exposição das fêmeas de camundongo ao ar ambiente. Esse achado representaria ou uma ausência de efeito da poluição ambiental sobre a reserva ovariana ou, caso esse efeito exista, não teria significado clínico em fêmeas de camundongo no início da vida reprodutiva.

Concluindo, este estudo fornece evidências pela primeira vez de que a exposição ao ar ambiente de um grande centro urbano pode afetar negativamente a saúde reprodutiva feminina, através da alteração do padrão de alocação das duas primeiras linhagens celulares do embrião no estágio de blastocisto. Baseando-se nessa observação e no fato de que uma redução significativa da população celular da MCI é incompatível com um desenvolvimento embrionário normal após a implantação, nossos resultados sugerem que a susceptibilidade diferencial das células MCI e TE à poluição ambiental poderia contribuir para um resultado reprodutivo adverso. A

coloração celular diferencial do embrião no estágio de blastocisto poderia ser utilizada como biomarcador para monitorar os efeitos da poluição ambiental sobre a saúde reprodutiva feminina em estudos experimentais. A projeção dessas observações para a arena clínica tem implicações importantes para a saúde reprodutiva de mulheres que residem em grandes centros urbanos e que estão sujeitas à exposição crônica ao MP_{2,5} alertando as agências ambientais a propor novas estratégias para o controle adicional dos níveis de poluentes nessas cidades.

A possível natureza cumulativa ou sinérgica dos efeitos da exposição crônica às variações diárias dos níveis de poluição ambiental pode alterar a fertilidade feminina sem nenhuma manifestação evidente por anos. Esse fato representa uma fonte de preocupação importante com relação à saúde reprodutiva feminina, principalmente quando o tecido ovariano, composto de células germinativas não renováveis (oócitos), é o alvo e o início precoce da menopausa, a única expressão clínica desses efeitos.

Estudos realizados em mulheres tabagistas, nas quais os efeitos adversos causados pela fumaça do cigarro poderiam compartilhar vias de ação com os efeitos causados pela exposição à poluição ambiental sobre o mecanismo reprodutivo, sugerem que a falência ovariana prematura ocorra cerca de três a cinco anos antes do que a observada na população geral (94-96). Esse efeito é mais evidente em mulheres que se aproximam do final de suas vidas reprodutivas, sugerindo que uma redução acelerada do

tamanho da população folicular ocorra nesse grupo etário específico (97). Em adição, as substâncias químicas tóxicas encontradas na fumaça do cigarro poderiam alterar a função ovariana, prejudicando a produção dos hormônios esteróides, o processo de expansão do complexo cúmulus-oócito e a maturação nuclear (92, 98).

Os resultados dos ciclos de FIVETE realizados em tabagistas e não tabagistas foram comparados em vários estudos e mostraram que tanto os parâmetros clínicos (pior resposta ovariana, consumo maior de gonadotrofinas, nível menor de estradiol no dia do desencadeamento da ovulação, maior taxa de cancelamento, aumento da taxa de abortamento) como os laboratoriais (menor número de oócitos recuperados, maturação oocitária reduzida, maior risco de falha de fertilização, menor taxa de implantação) foram piores no grupo de tabagistas (99-104). Contudo, estudos recentes foram incapazes de confirmar esses efeitos resultantes da exposição à fumaça do cigarro (102, 105).

Baseando-se nos resultados dos estudos anteriores realizados em nosso laboratório (38, 51, 52), no efeito negativo que o tabagismo exerce sobre a reserva ovariana, aumentado a taxa de atresia folicular e acelerando a perda da função reprodutiva de maneira mais evidente em mulheres de idade mais avançada (99, 106) e na tendência atualmente observada em nossa sociedade na qual as mulheres retardam a maternidade para o período mais próximo do final de suas vidas reprodutivas, este estudo

experimental foi desenhado, utilizando o mesmo modelo do estudo com fêmeas jovens, para testar a hipótese de que a exposição crônica à poluição particulada ambiental poderia ter um impacto maior sobre o mecanismo reprodutivo feminino nesse período da vida.

Neste estudo confirmamos os resultados anteriores que mostravam que a exposição crônica pré-concepcional ao $MP_{2,5}$ ambiente não alterou a fertilização ou desenvolvimento embrionário *in vitro*, mas reduziu de maneira significativa a alocação de células para a linhagem embrionária, sem alterar o número total de células dos blastocistos, sugerindo um desvio da segregação celular para a linhagem placentária e comprometendo, desta forma, o potencial de implantação e viabilidade embrionária. Mais uma vez verificamos que os embriões de fêmeas de camundongo expostas ao $MP_{2,5}$ ambiente no período pré e/ou pós-natal apresentaram um padrão similar de alteração da segregação celular dos blastocistos, refletindo que esse efeito não foi acentuado pela exposição pré-natal e que poderia ser ligado diretamente à exposição pós-natal. Adicionalmente, apesar do $MP_{2,5}$ conter concentrações elevadas de substâncias tóxicas, tais como compostos orgânicos e metais solúveis, podendo desta forma compartilhar uma via de ação comum com a fumaça do cigarro sobre a reserva ovariana, nossos resultados mostraram que a distribuição dos diferentes padrões de resposta ovariana às gonadotrofinas não foi modificado no final da vida reprodutiva pela exposição crônica das fêmeas à poluição particulada ambiental, sugerindo que a população feminina em idade mais avançada não seria

mais susceptível aos efeitos da poluição ambiental sobre sua saúde reprodutiva.

Em resumo, este estudo fornece suporte adicional à observação prévia de que a exposição crônica ao $MP_{2,5}$ ambiente pode alterar de maneira similar o padrão de alocação das duas primeiras linhagens celulares dos embriões em estágio de blastocisto tanto no início como no final da vida reprodutiva de fêmeas de camundongo, comprometendo o potencial de implantação e viabilidade futura destes embriões. A redução específica da população de células da MCI poderia contribuir para o esclarecimento do mecanismo pelo qual a exposição à poluição particulada ambiental aumentaria as taxas de falha de implantação e de perda inicial da gestação. A observação de que esse efeito não é acentuado no final da vida reprodutiva teria um efeito tranquilizador para mulheres que habitam em grandes centros urbanos.

A revisão crítica dos estudos da minha linha de pesquisa envolvendo os efeitos da exposição crônica pré-concepcional à poluição particulada ambiental sobre o desenvolvimento embrionário nos extremos da vida reprodutiva, aponta os seus principais pontos fortes e limitações com relação aos resultados obtidos, sua análise e validação. A metodologia utilizada para a exposição dos animais ao material particulado ambiental representa um dos pontos positivos dessa linha de pesquisa, pois reproduz uma condição muito próxima àquela observada em grandes centros urbanos. Outro ponto

de destaque esta relacionado ao desenho experimental empregado nos estudos, nos quais os períodos de avaliação corresponderam aos extremos da vida reprodutiva de fêmeas de camundongo que compartilharam as mesmas condições de exposição durante a gestação e seis primeiras semanas de vida pós-natal. Este desenho possibilitou a confirmação da alteração da segregação das duas primeiras linhagens celulares dos embriões em estágio de blastocisto nestes dois grupos etários e mostrou que a exposição crônica à poluição ambiental particulada ao longo de toda vida reprodutiva não acentuou esta alteração a despeito da variabilidade genética presente na população.

Contudo, algumas limitações desses estudos devem ser ressaltadas. Em primeiro lugar, as características das câmaras de exposição ao ar ambiente e ar filtrado, que por um lado criam condições mais próximas àquelas observadas na “vida real” de qualquer grande centro urbano, por outro impedem uma atribuição específica da toxicidade reprodutiva ao $MP_{2,5}$ ambiente uma vez que as concentrações dos poluentes gasosos (CO , NO_2 , SO_2) são similares nas duas câmaras e a interação destes poluentes com o $MP_{2,5}$ poderia modificar este efeito. A interação física e química desses componentes, diretamente dependente da temperatura, umidade e luz solar, poderia afetar sua composição e características químicas, resultando na produção de compostos novos desconhecidos com toxicidade aumentada (107). Por esse motivo esse efeito tóxico não pode ser atribuído a um componente específico do ar ambiente, embora o $MP_{2,5}$ tenha sido o único

componente que apresentava concentrações diferentes nas câmaras de exposição.

Em segundo lugar, o próprio protocolo de fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro* utilizado para a produção dos blastocistos nesses estudos limita a extrapolação dos efeitos negativos da exposição ao MP_{2,5} ambiente sobre a segregação celular dos embriões em estágio de blastocisto à população geral, uma vez que não temos como grupo controle blastocistos derivados de zigotos produzidos *in vivo* para avaliar esse efeito. Contudo, como o objetivo desses estudos era justamente avaliar os efeitos da exposição ambiental sobre o desenvolvimento embrionário, isso não seria possível se recuperássemos os embriões produzidos *in vivo* no estágio de blastocisto, pois todo o desenvolvimento embrionário teria ocorrido sem acompanhamento.

Finalmente, embora tenhamos encontrado uma evidência biológica que sugere o mecanismo pelo qual a exposição à poluição particulada ambiental poderia influenciar negativamente a viabilidade da gestação, essa hipótese não foi testada através da transferência dos blastocistos produzidos em cada protocolo de exposição para o útero de fêmeas pseudográvidas. A resposta a essa limitação só poderá ser obtida através da realização de novos estudos avaliando os efeitos da exposição ao ar ambiente sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional *in vitro* e pós-implantacional *in vivo*, investigando outros parâmetros reprodutivos, tais como, taxa de

implantação, duração da gestação, crescimento intra-uterino retardado e taxas de perda e de anomalias fetais.

Em 1962, Rachel Carson publicou seu livro *Silent Spring* (108) que se tornou uma das pedras angulares do novo movimento ecológico, o qual posteriormente inspirou a criação da Agência de Proteção Ambiental (EPA) nos EUA, mudando para sempre o modo de olharmos para o meio ambiente ao nosso redor e, desde então, os animais silvestres passaram a ser vistos como importantes sentinelas da saúde dos ecossistemas. As observações apresentadas nessa obra levaram a uma percepção restritiva por muitos cientistas de que o principal ponto de avaliação seria a mortalidade e, conseqüentemente, o declínio dos números das populações das diferentes espécies. Contudo, a leitura cuidadosa desse livro e de vários estudos científicos subseqüentes aponta para um grupo expressivo de pontos de avaliação distintos. Nessa análise, a mortalidade não é excluída, mas a redução do tamanho populacional das diferentes espécies dos ecossistemas pode também ser atribuída às alterações da fertilidade e fecundidade dos indivíduos que compõem as populações avaliadas, indicando a importância da inclusão de pontos de avaliação reprodutivos na análise dos efeitos dos poluentes ambientais sobre as populações estudadas (109).

Com relação aos efeitos da exposição aos contaminantes presentes no ar ambiente de grandes centros urbanos, observa-se que a maior parte dos estudos encontrados na literatura científica também está ligada à

mortalidade e ao câncer. O número restrito de estudos que avalia os efeitos da exposição ao MP associado aos poluentes gasosos sobre a saúde reprodutiva humana restringe-se ao período gestacional ou mecanismo reprodutivo masculino. A falta de estudos relacionados à influência da contaminação ambiental sobre a fertilidade feminina, provavelmente decorrente da dificuldade de se estabelecer uma clara correlação entre a poluição do ar e redução da fertilidade devido à complexidade da interação entre os fatores envolvidos no mecanismo reprodutivo, associada à diminuição da fertilidade em todos os grupos etários e a percepção de uma crescente preocupação por parte da população, resultou na criação de um grupo multidisciplinar de interesse especial dentro da ASRM em outubro de 2005 voltado especificamente para discutir e estabelecer diretrizes para estudos futuros sobre os agentes poluentes ambientais e o comprometimento da fertilidade humana.

Em janeiro de 2007, a “Conferência dos Desafios Ambientais sobre a Fertilidade e Saúde Reprodutiva”, realizada em São Francisco (EUA), aglutinou o campo da saúde reprodutiva ambiental, reunindo cerca de 400 cientistas, pesquisadores, profissionais da área de saúde, pós-graduandos, grupos afetados, representantes políticos e da sociedade e diferentes grupos da mídia, para discutir o que se sabe atualmente sobre os impactos dos contaminantes ambientais sobre a fertilidade e saúde reprodutiva. O grupo multidisciplinar reunido definiu como foco da saúde reprodutiva ambiental a exposição aos contaminantes ambientes (substâncias químicas sintéticas e

metais), particularmente durante períodos críticos do desenvolvimento, tais como o período anterior à concepção e o pré-natal, e os seus potenciais efeitos em todos os aspectos do futuro da saúde reprodutiva através do curso da vida, incluindo concepção, fertilidade, gestação, desenvolvimento na infância, na adolescência e na idade adulta. Os dados apresentados pelo grupo multidisciplinar de cientistas trouxeram à tona uma preocupação com relação ao futuro da saúde dos indivíduos e famílias e indicaram o estabelecimento de condições apropriadas para melhorar a saúde através da pesquisa, da educação, dos meios de comunicação, de ações comunitárias e de mudanças de políticas públicas de saúde (110). As ações prioritárias para o direcionamento futuro das pesquisas nessa área foram assim identificadas: 1) estabelecimento de desenhos longitudinais dos estudos animais e humanos que levem em consideração o ciclo de vida completo; 2) desenvolvimento de marcadores biológicos de exposição e de indicadores pré-clínicos de doença em animais e humanos; 3) desenvolvimento de sistemas para a identificação de novos contaminantes; 4) identificação dos mecanismos de ação dos diferentes poluentes; 5) incorporação ao desenho dos estudos epidemiológicos dos dados biológicos coletados e; 6) aporte de recursos para áreas emergentes de pesquisa envolvidas no estudo de substâncias químicas isoladas ou em mistura e seus efeitos sobre o epigenoma, a programação fetal e transmissão a gerações futuras, incluindo análises de exposição crônica a baixas concentrações, curvas de dose-resposta não tradicionais e interação entre receptores e sistemas endócrinos (110).

Apesar de se observarem nos últimos anos esforços crescentes por parte de agências reguladoras governamentais para tornar o meio ambiente mais limpo, a poluição ambiental ainda representa um importante problema de saúde pública, particularmente em países em desenvolvimento nos quais tanto a falta de investimentos em novas tecnologias como uma legislação ambiental ineficiente determinam que o controle da emissão de poluentes ainda seja insatisfatório nos grandes centros urbanos. A identificação nos estudos apresentados acima do período pré-concepcional como uma janela de susceptibilidade do mecanismo reprodutivo aos efeitos da exposição crônica ao MP presente no ar ambiente de um grande centro urbano representa mais um passo do conhecimento científico que, associado ao conjunto de dados existentes, pode ser útil no processo de estabelecimento de políticas ambientais. Com essas informações, as autoridades competentes devem ser alertadas sobre a necessidade de se expandir a rede de monitoramento da qualidade do ar ambiente, de melhorar a qualidade da avaliação da exposição e de revisar os níveis de exposição aos poluentes presentes no ar ambiente estabelecendo limites aceitáveis que seriam considerados como seguros para a saúde reprodutiva humana, beneficiando diretamente a saúde desta e de gerações futuras através de novas políticas direcionadas à preservação do meio ambiente.

6. CONCLUSÕES

As conclusões de cada um dos projetos da linha de pesquisa desenvolvida para avaliar os efeitos da exposição crônica ao $MP_{2,5}$ ambiente sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional de fêmeas de camundongo nos extremos da vida reprodutiva são apresentadas abaixo:

6.1. Projeto Coloração Diferencial

Neste estudo, a observação prévia que sugere o protocolo de incorporação do IP nas células TE após sua permeabilização com um detergente não iônico seguida pela fixação com EtOH como o método mais eficiente para a coloração diferencial das duas primeiras linhagens celulares dos blastocistos foi confirmada. A comparação da eficiência das diferentes soluções de fixação utilizadas neste método de coloração foi reportada neste estudo pela primeira vez. As necessidades da identificação de outras soluções de fixação e do aperfeiçoamento do uso desta metodologia são enfatizadas pelo fato de que a eficiência do processo de coloração varia de acordo com a solução de fixação e que certos anticorpos são extremamente sensíveis a certos agentes fixadores, impedindo desta forma a associação da coloração diferencial da segregação celular no blastocisto a outras técnicas tais como, citoquímicas ou imunohistoquímicas. A capacidade de associação destas técnicas diferentes possibilitaria a identificação mais precisa de cada uma das populações celulares ou mesmo sua expressão diferencial de proteínas específicas.

6.2. Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Início da Vida Reprodutiva

Este estudo fornece pela primeira vez evidências de que a exposição ao ar ambiente de um grande centro urbano pode afetar negativamente a saúde reprodutiva feminina através da alteração do padrão de alocação das duas primeiras linhagens celulares do embrião no estágio de blastocisto. Baseando-se nessa observação e no fato de que uma redução significativa da população de células MCI é incompatível com o desenvolvimento embrionário normal após a implantação, esses resultados sugerem que a sensibilidade diferencial das células MCI e TE à poluição ambiental poderia contribuir para o resultado obstétrico adverso. A coloração celular diferencial no estágio de blastocisto poderia ser proposta como um marcador biológico para o monitoramento dos efeitos da poluição ambiental sobre a saúde reprodutiva feminina em estudos experimentais. A elucidação do mecanismo através do qual a poluição ambiental altera a especificação das linhagens celulares no blastocisto será objeto de um próximo estudo. A extrapolação dessas observações à arena clínica tem importantes implicações na saúde reprodutiva de mulheres que habitam em uma grande região urbana e que estão sujeitas à exposição crônica ao MP_{2,5} ambiente. Os resultados deste estudo poderiam servir como base para alertar as agências de controle ambiental para a proposição de novas estratégias para a redução adicional dos níveis de poluição ambiental nas metrópoles.

6.3. Projeto Exposição de Fêmeas de Camundongo ao Material Particulado Ambiental – Final da Vida Reprodutiva

Este estudo fornece suporte adicional às nossas observações prévias de que a exposição crônica pré-concepcional ao MP_{2,5} ambiente pode de fato afetar de maneira similar o padrão de alocação das duas primeiras linhagens celulares do embrião no estágio de blastocisto tanto em fêmeas de camundongo no início como no final de suas vidas reprodutivas, comprometendo o potencial de implantação e viabilidade futura dos embriões, sem contudo alterar a fertilização ou desenvolvimento embrionário *in vitro*. A redução específica da população de células da MCI poderia contribuir para o esclarecimento do mecanismo pelo qual a exposição à poluição particulada ambiental aumentaria as taxas de falha de implantação e de perda inicial da gestação. Adicionalmente, apesar do MP_{2,5} conter concentrações elevadas de substâncias tóxicas tais como compostos orgânicos e metais solúveis, podendo desta forma compartilhar uma via de ação comum com a fumaça do cigarro sobre a reserva ovariana, nossos resultados mostraram que a distribuição dos diferentes padrões de resposta ovariana às gonadotrofinas não foi modificado no final da vida reprodutiva pela exposição crônica das fêmeas à poluição particulada ambiental, sugerindo que a população feminina em idade mais avançada não seria mais susceptível aos efeitos da poluição ambiental sobre sua saúde reprodutiva.

7. ANEXOS

Os anexos representam cada um dos artigos científicos que foram escritos e submetidos à publicação em revistas médicas internacionais, resultado da minha linha de pesquisa na qual foram avaliados os efeitos da exposição crônica ao MP_{2,5} ambiente sobre o desenvolvimento embrionário pré-implantacional de fêmeas de camundongo nos extremos da vida reprodutiva.

7.1. Anexo A

Evaluation of different methods of cell fixation and membrane permeabilization for the differential staining of inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) of mouse blastocysts

Running Title: Cell lineage differential staining in mouse blastocysts

Authors:

Mariangela Maluf, M.D. ^{a,c}

Paulo Marcelo Perin, M.D. ^{a,c}

Daniela Aparecida Nicolosi Foltran Januário, B.Sc. ^{b,c}

Paulo Hilário Nascimento Saldiva, M.D., Ph.D. ^a

^a Department of Pathology, and ^b Department of Experimental Physiopathology, School of Medicine, University of São Paulo (Postal Code: 01246-903); ^c Division of Reproductive Medicine, CEERH – Specialized Center for Human Reproduction, São Paulo, Brazil (Postal Code: 01243-020).

Correspondence address: Mariangela Maluf, M.D., Division of Reproductive Medicine, CEERH – Specialized Center for Human Reproduction, R. Pará, n. 50, 12th floor, São Paulo 01243-020, Brazil (FAX: 55-11-3258-0008; E-mail: mariangela@ceerh.com.br).

Abstract

Background: Differential staining is used to distinguish ICM from TE allowing for more accurate evaluation of the quality and normality of blastocysts. Yet, some issues like cell membrane permeabilization and fixation are not well established. For this purpose we assessed different methodologies used in cell lineage differential staining of blastocysts.

Methods: Cells of zona-intact mouse blastocysts obtained from IVF were permeabilized and stained using different concentrations of a detergent (TX-100; 0.5% or 1%) and propidium iodide (PI; 50 µg/mL or 100 µg/mL), followed by overnight incubation in a solution containing different fixatives (ethanol, methanol, paraformaldehyde - PFA 1% or 4%) and bisbenzimidazole. To evaluate the staining quality and count differentially the nuclei, blastocysts were mounted and viewed using epifluorescence microscopy.

Results: Staining quality score was significantly different ($P < 0.05$) among all fixative solutions and was higher for ethanol followed by methanol, PFA1%, and PFA4%. Changes in PI concentration and use of different fixative solutions revealed significant effects on ICM cell count and ICM/TE ratio. Different concentrations of the detergent used for cell permeabilization showed significant effects on TE cell counts and ICM/TE ratio.

Conclusion: The protocol using 1% TX-100 for cell permeabilization, 50 µg/mL of PI for TE cell staining, and ethanol as a fixative solution is the most efficient method for cell lineage differential staining and counting at the blastocyst stage.

Key words: *in vitro* fertilization, blastocyst, lineage specification, differential staining, mouse.

Introduction

The murine *in vitro* fertilization (IVF) and embryo culture system has been used for many years as a model for human IVF due to its relevance not only to the understanding of physiological and molecular events of the reproductive and developmental processes but also allowing the observation of unique events that can not be followed *in vivo* such as: a) the cell division rate; b) the blastomere morphology and quality (regularity, symmetry, fragmentation, multinucleation); c) the rate of progression to the blastocyst stage; d) the rate and pattern of the hatching process; and e) the evaluation of the first cell lineage segregation in the blastocyst, important parameters of embryo quality and predictive for implantation potential.

The formation of the blastocyst results from the functional differentiation of embryonic cells into two distinct lineages, the inner cell mass (ICM) cells that bring about all embryonic tissues and part of the extraembryonic membranes and the trophectoderm (TE) cells that contribute mainly to the formation of the fetal placenta (Yamanaka et al. 2006). Both cell lineages as well as their ratio have a fundamental role in embryo survival and fetal viability and the blastocyst has the tools necessary to control the specification of those cell lineages within a relatively narrow range (Fleming et al. 2004; Hardy et al. 2003; Iwasaki et al. 1990; Leppens et al. 1996). Thus, further developmental information can be obtained when differential counting of these two distinct

cell populations is performed since the ratio of ICM to TE in the blastocyst is important to normal implantation and post-implantation development.

Initial approaches for differential staining in blastocysts included ICM isolation by micromanipulation and immunosurgery using complement mediated membrane lysis in TE cells, both techniques expensive, time consuming and dependent on the staining efficiency of the antibodies which is often inconsistent, due to the conditions (duration, temperature, concentration) at which they were incubated (Gardner et al. 1973; Solter and Knowles 1978). Recently a direct modification of a chemically defined antibody-free method has been published and involved the permeabilization of TE cells by brief exposure of zona-intact blastocysts to a non-ionic detergent solution containing fluorochrome propidium iodide (PI), followed by overnight incubation in a fixative solution containing fluorochrome bisbenzimidazole (Thouas et al. 2001). The benefits of this technique over previously reported methods include its simplicity and quickness in execution as well as its cost-effectiveness, allowing for more accurate and reliable evaluation of the two cell populations forming the blastocyst.

Yet, some issues like cell fixation and cell membrane permeabilization are not well established and there have been no reports comparing modifications of this technique in regard to the exposure of blastocysts to variable concentrations of the detergent, the use of different concentrations of the nuclear stain, and the evaluation of different fixative solutions, suggesting

that new studies should be developed focusing on these parameters to optimize the methodology. Therefore, the purpose of this study was to compare different methodologies of cell membrane permeabilization, nuclear staining, and cell fixation for the differential cell lineage specification of mouse blastocysts.

Materials and Methods

Animals

Random-bred 8 to 10-week-old Swiss albino mice (School of Medicine, University of São Paulo, SP, Brazil) were used for the study. The mice were housed in polycarbonate cages with wood shavings on the floor, in a room under controlled environmental conditions of 12 light / 12 dark photoperiod, relative humidity of $50\pm 10\%$, and temperature of $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$. Cage cleaning and bedding changes were done every other day. Animals received a supply of balanced commercial food (Nuvital-Nutrients Ltda., Colombo, Paraná, Brazil) and fresh water *ad libitum*. All animals were killed by cervical dislocation. Protocols used in this study were approved by the ethics committee of the School of Medicine, University of São Paulo, and followed the “Principles of Laboratory Animal Care” published by the U. S. National Institutes of Health.

In Vitro Fertilization and Embryo Culture

The IVF and embryo culture were performed according to procedures previously described (Perin et al. In press). Briefly, different culture media were used for each IVF step: a) collection of oocytes from oviducts and isolation of the cauda epididymis and vas deferens (collection medium), modified human tubal fluid (mHTF no. 90126; Irvine Scientific, Santa Ana, CA) prewarmed to 37°C, b) sperm capacitation and IVF (insemination medium), human tubal fluid (HTF no. 90125; Irvine Scientific) containing 10% serum substitute supplement (SSS no. 99193; Irvine Scientific), and c) embryo culture, potassium-enriched simplex optimized medium (KSOM) with glucose and amino acids (no. MR-107; Specialty Media, Chemicon, Phillipsburg, NJ) supplemented with 5 mg/ml of human serum albumin (HSA-solution™ no. 10064; Vitrolife AB, Gothenburg, Sweden). Insemination and embryo culture media were overlaid with embryo-tested mineral oil (Oil for Embryo Culture #9305; Irvine Scientific) and equilibrated overnight in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C. The same batch of each culture medium was used in all experiments. For each protocol of cell membrane permeabilization and cell fixation oocytes were obtained from 6-week-old mice using intraperitoneal injection of 10 IU of equine chorionic gonadotrophin (eCG, Folligon® 1,000 IU; Intervet International, São Paulo, São Paulo, Brazil) followed 48 hours later by intraperitoneal injection of 10 IU of human chorionic gonadotrophin (hCG, Choragon® 5,000 IU; Ferring, São Paulo, São Paulo, Brazil). Females were killed 14 to 16 hours after hCG administration. Ovulated oocytes were released from the ampullar oviduct

and placed into insemination medium. To obtain sperm, proven 10-week-old breeder males were killed 12 to 13 hours after the females were injected with hCG and the cauda epididymis and vas deferens were removed from each testis and placed in insemination medium. Spermatozoa were gently squeezed out of the epididymis using a watchmaker's forceps and residual caudal tissue was discarded. Capacitation was allowed to proceed for 60 to 90 min at 37°C in 5% CO₂. The IVF and embryo culture procedures were performed in an HEPA-VOC filtration system incubator (Series II Water Jacketed Incubator, Model 3110; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Sperm and oocytes were mixed and incubated for four to six hours. Fertilized oocytes from each female were allotted in groups of 10 and cultured in 20- μ L drops of embryo culture medium for 96 hours.

Cell Lineage Differential Staining in Blastocysts

By day four of culture (96 hours post-insemination), forty-eight zona-intact blastocysts produced *in vitro* from each female were randomly incubated (groups of three) for 10 seconds in 500- μ L of HTF containing either 0.5% or 1% Triton X-100 (TX-100; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) for partial permeabilization and 50 μ g/mL or 100 μ g/mL propidium iodide (PI; Chemicon, Phillipsburg, NJ) for TE cell staining. The blastocysts were then transferred to four different fixative solutions: a) Ethanol PA – EtOH (no. 1.00983.1000; Merck KGaA, Darmstadt, Germany); b) Methanol – MEtOH (no. 1.06008.6010; Merck KGaA); c) 1% Paraformaldehyde – PFA1% (no.

P6148; Sigma-Aldrich); and d) 4% Paraformaldehyde – PFA4% (no. P6148; Sigma-Aldrich), containing 25 µg/mL bisbenzimidazole (H33258; Hoechst Pharmaceuticals, Frankfurt, Germany) for total cell staining and stored overnight at 4°C (EtOH, PFA1%, PFA4%) or at -20°C (MEtOH). Fixed and stained blastocysts were transferred into glycerol, individually placed on glass microscope slides under coverslips and visualized for ICM and TE differential staining quality assessment. The quality of cell lineage staining in blastocysts was graded on a scale of one to four, where 1 = nuclear morphology poorly preserved, most or all nuclei stained by bisbenzimidazole (blue); 2 = nuclear morphology well preserved, nonspecific staining of nuclei by PI (red/pink); 3 = nuclear morphology well preserved, specific staining but difficulty in differentiating ICM (blue) from TE (pink) nuclei; and 4 = nuclear morphology well preserved, specific staining and easy differentiation of ICM (blue) from TE (pink) nuclei (Figure 1). A weighted staining quality score representing the sum of the staining grade of every blastocyst divided by the total number of blastocysts was calculated for each one of the sixteen different protocols used for permeabilization, staining and fixation of blastocysts for differential cell lineage determination. The present system awards a total possible score of four for each protocol. The ICM and TE cell numbers and the ratio of ICM to TE cells of blastocysts presenting an individual staining quality score \geq three were determined for each protocol. Differential staining quality assessment and blastocyst cell counting were performed from digital photographs of images obtained on an epifluorescence microscope (Eclipse 90i; Nikon, Melville, NY) fitted with a

mercury lamp and excitation filters (460 nm for blue and red fluorescence, and 560 nm for red only). An observer blind to experimental protocols performed all evaluations.

Experimental Design and Statistical Analysis

One blastocyst represented an experimental unit. Each one of the sixteen possible combinations among cell permeabilization, staining of TE cells, and fixation and total cell staining protocols were analyzed as categorically independent variables to evaluate their effect on cell lineage differentiation quality. The dependent variable for this assessment was the staining quality score. The effect of individual protocols on the staining quality score was evaluated through analysis of variance (ANOVA). The Tukey HSD *post hoc* test was used for all comparisons of the categorically dependent variables among different fixative solution protocols. The effects of the different concentrations of the detergent and PI, and of the different fixative solutions on the differential cell counts were evaluated through multivariate analysis of variance (MANOVA). The Tukey HSD *post hoc* test was used for all comparisons of individual dependent variables (ICM cells, TE cells, ICM/TE ratio) among the different fixative solutions. A computer-generated list of random numbers was used whenever randomization was necessary in this study. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). The data were analyzed using Statistics Package for Social Sciences version 13.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL).

Results

Means \pm SD for all staining quality scores according to the cell permeabilization, staining of TE cells, and blastocyst fixation and total cell staining protocols used for differential cell lineage determination in blastocysts are reported in Table I. The highest staining quality scores were observed for the protocols using EtOH as a fixative solution. The lowest scores were observed for the fixative solution PFA4%, no matter the PI or TX-100 concentration.

The ANOVA of the effect of cell permeabilization, staining of TE cells, and fixation and total cell staining protocols used for differential cell lineage determination in blastocysts on the staining quality score is shown in Table II. The fixative solution correlated significantly with the staining quality score ($P = 0.000$). No difference was found for the concentration of PI or detergent used in this study. The interaction between PI and the detergent or the fixative solution, the detergent and the fixative solution, and the interaction among the three factors were not significant for the staining quality score. *Post hoc* comparison of the effects of the different fixative solutions on the staining quality score showed a significant difference among them (Table III). The score was significantly different ($P < 0.05$) among all fixative solutions and was higher for EtOH followed by MEtOH, PFA1%, and PFA4%.

Means \pm SD for the different cell populations and their ratio in blastocysts according to the staining protocols are reported in Table IV. The multivariate effects for PI, detergent, fixative solution, and PI versus detergent interaction on the differential cell counts of blastocysts are shown in Table V. No significant PI versus fixative solution, detergent versus fixative solution, or PI versus detergent versus fixative solution interactions on the differential cell counts of blastocysts were observed (Table V).

The effects of different concentrations of PI and detergent, and fixative solutions on the differential staining of the first two cell lineages of the blastocyst are shown in Table VI. The change of PI concentration and the use of different fixative solutions revealed significant effects on ICM cell count and ICM/TE ratio, but did not show any effect on TE cell count. The different concentrations of the detergent used for cell permeabilization in this study showed significant effects on TE cell counts and ICM/TE ratio, but did not reveal any effect on ICM cell count. No significant PI and/or detergent and/or fixative solution interactions on the specific blastocyst cell populations were observed. ICM cell counting is significantly affected by the change in PI concentration. The detergent analyzed as a single independent variable had no influence on this counting. However, a significant effect of the interaction between PI and detergent concentrations on the counting of ICM cells of blastocysts is shown in Tables V and VI.

Discussion

The data presented here show that the quality of the differential cell lineage staining in zona-intact mouse blastocysts is significantly affected by the fixative solution but not by PI or detergent concentrations used in this study. The comparison of the effects of the four fixative solutions on the differential staining quality score shows that significantly higher scores were obtained for protocols using EtOH as a fixative solution. Even though the quality of differential cell lineage staining was not affected by PI or detergent, changes in their concentration as well as the interaction between them significantly affected ICM and TE cell counts. The differential cell count was also significantly affected by the fixative solution employed. The results provide evidence suggesting the protocol using 1% TX-100 for cell permeabilization, 50 µg/mL of PI for TE cell staining, and EtOH as a fixative solution is the most efficient method for the cell lineage differential staining and counting at the blastocyst stage.

The differential staining of the first two cell populations of blastocysts in most recent experimental studies assessing embryo quality are still based on the technique described by Handyside & Hunter (1984) in which, after the removal of the zona pellucida, TE nuclei are labeled with fluorochrome PI after permeabilization of the cells using selective antibody-mediated complement lysis and ICM nuclei with fluorochrome bisbenzimidazole, even though its efficiency depends on a variety of conditions including the level of antigen expression, the chemical stability and specificity of the antibody, and

reproducibility of incubation parameters. In order to overcome these limitations simplified chemically-defined methods using either calcium ionophore (Fuente and King 1997) or a non-ionic detergent solution (Thouas et al. 2001) to permeabilize TE cells to PI allowed the differential staining of ICM and TE cells in a cost-effective, less time-consuming, and highly efficient manner. For these methods the presence or absence of the zona pellucida does not appear to inhibit or improve dye penetration. However, the chemical methods still have some disadvantages including their dependence on physical parameters (temperature, reagent concentration, permeability), blastocyst cell numbers, and exposure times (Thouas et al. 2001).

Additionally, the need to identify other fixative solutions is stressed by the fact that some antibodies are extremely sensitive to some fixatives and this could prevent the association of differential staining with other techniques like immunohistochemistry or cytochemistry. The ability to associate these techniques could help to more precisely identify each cell population and its integrity or differential expression of specific proteins. In a recent study, Fouladi-Nashta et al. (2005) described a method allowing concurrent differential staining for determination of ICM to TE cell ratio and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUDP nick-end labeling (TUNEL) for the detection of apoptosis. Although the investigators used a method similar to that of Thouas et al. (2001) for TE cell permeabilization and staining, they changed the fixative solution to 4% PFA based on the fact that formaldehydes cross-link between proteins retaining cellular constituents in

their cell location and that alcohols induce nicks in the DNA causing false positive TUNEL staining, emphasizing the role of the fixative solution as a critical factor for the correct staining of blastocysts.

In regard to the efficiency of the differential staining process according to the fixative solution selected, our results were comparable to those found by Thouas et al. (2001) in terms of specific blastocyst cell lineage staining for the EtOH group (81.7% and 80.0%, respectively). However, the data presented here showed a significantly lower efficiency for the other fixative solutions (MEtOH: 60%; PFA1%: 35%; PFA4%: 8%). The poor results for the PFA4% group found in our study may be related to the overnight incubation at 4°C since Fouladi-Nashta et al. (2005) presented good results for this fixative after a 30-minute incubation period at room temperature. This observation points out the importance of careful selection of the fixative used for the blastocyst cell lineage differential staining and the necessity of optimizing methodology in order to obtain maximum efficiency in the experimental study.

The results of our study confirm the data presented by Thouas et al. (2001) showing that the staining patterns and proportions of ICM and TE nuclei in mouse blastocysts treated using a chemically-defined protocol were comparable to those using complement-mediated techniques (Biggers et al. 2000; Liu et al. 2006; Summers et al. 2000). However, in order to further refine the technique we tested the effects of varying the concentration of

detergent and PI for each fixative solution on the identification of the two distinct cell populations (ICM and TE cells) present in zona-intact mouse blastocysts, based on the fact that the success and reproducibility of the differential staining are not only dependent on the incubation time, but also on the concentration of the detergent and PI used for partial permeabilization and staining of TE cells. In the current experiment we found that the blastocyst differential staining quality was not affected by the change in detergent and/or PI concentration but was directly affected by the fixative solution used. Increase in the detergent and/or PI concentration had an important negative effect on cell lineage differential counting at the blastocyst stage for all fixative solutions except EtOH. This negative effect was minimized in MEtOH and PFA1% but not in PFA4% groups by reducing both PI and detergent concentration. In the EtOH group the protocol in which the concentration of PI was reduced to 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and of the detergent maintained at 1% significantly improved the differential cell counting. Even though it is impossible to compare the absolute numbers of ICM and TE cells observed in our study to those shown by Thouas et al. (2001) due to differences in the development stage at which the blastocysts were stained, we found similar results for the percentage of ICM cells in relation to the total cell number and in the ICM/TE ratio for the EtOH group (26.0% and 27.8%; 0.38 and 0.38, respectively). For the protocol with the specific reduction of PI concentration by 50% we observed better results for both ICM cells in relation to the total cell number and the ICM/TE ratio (32.8% and 0.40).

In conclusion, this study confirms previous observation suggesting PI incorporation after TE cell permeabilization and EtOH fixation as the most efficient protocol for cell lineage differential staining in blastocysts. The comparison of the efficiency of different fixative solutions for this staining method is reported in this study for the first time. The need to identify other fixative solutions and to optimize the methodology for their use is stressed by the fact that the efficiency of the staining process varies according to the fixative solution and that some antibodies are extremely sensitive to some fixatives preventing the association of differential staining with other techniques like immunohistochemistry or cytochemistry. The ability to associate these techniques could help to more precisely identify each cell population or its differential expression of specific proteins.

Acknowledgments: The authors would like to thank Alessandro M. Mazzoni, B.Sc., Ph.D. for his assistance with the statistical analysis.

References

- Biggers J, McGinnis L, Raffin M (2000) Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free KSOM. *Biol Reprod* 63: 281-293
- Fleming T, Kwong W, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, Miller D, Watkins A, Eckert J (2004) The embryo and its future. *Biol Reprod* 71: 1046–1054
- Fouladi-Nashta A, Alberio R, Kafi M, Nicholas B, Campbell K, Webb R (2005) Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reprod BioMed Online* Vol 10: 497–502
- Fuente R, King W (1997) Use of a chemically defined system for the direct comparison of inner cell mass and trophectoderm distribution in murine, porcine and bovine embryos. *Zygote* 5: 309-320

- Gardner R, Papaioannou V, Barton S (1973) Origin of the ectoplacental cone and secondary giant cells in mouse blastocysts reconstituted from isolated trophoblast and inner cell mass. *J Embryol Exp Morphol* 30: 561-72
- Handyside A, Hunter S (1984) A rapid procedure for visualising the inner cell mass and trophectoderm nuclei of mouse blastocysts in situ using polynucleotide-specific fluorochromes. *J Exp Zool* 231: 429-434
- Hardy K, Stark J, Winston R (2003) Maintenance of the inner cell mass in human blastocysts from fragmented embryos. *Biol Reprod* 68: 1165-1169
- Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T (1990) Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *J Reprod Fertil* 90: 279-284
- Leppens G, Gardner D, Sakkas D (1996) Co-culture of 1-cell outbred mouse embryos on bovine kidney epithelial cells: effect on development, glycolytic activity, inner cell mass:trophectoderm ratios and viability. *Hum Reprod* 11: 598-603
- Liu C, Lee M, Hsieh C, Huang C, Tsao H, Hsieh Y (2006) Prostacyclin enhances mouse embryo development and hatching but not increased embryonic cell number and volume. *Fertil Steril* 86(Suppl 3): 1047-1052
- Perin P, Maluf M, Januario D, Saldiva P (In press) Comparison of the efficacy of two commercially available media for culturing one-cell embryos in the in vitro fertilization (IVF) mouse model. *Fertil Steril*
- Solter D, Knowles B (1978) Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 5565-5569
- Summers M, McGinnis L, Lawitts J, Raffin M, Biggers J (2000) IVF of mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids. *Hum Reprod* 15: 1791-1801
- Thouas G, Korfiatis N, French A, Jones G, Trounson A (2001) Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod BioMed Online* 3: 25-29
- Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson R, Rossant J (2006) Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn* 235: 2301-2314

Table I. Effects of two different concentrations of detergent for partial permeabilization and propidium iodide for trophectoderm cell staining on the score of cell lineage differential staining quality assessment in blastocysts according to the fixative solution used.

Fixative Solution	Propidium Iodide 50 μ g/ml		Propidium Iodide 100 μ g/ml	
	TX-100 0.5%	TX-100 1%	TX-100 0.5%	TX-100 1%
EtOH	2.67 \pm 1.29	3.00 \pm 0.93	3.40 \pm 1.01	3.00 \pm 0.00
MEtOH	2.67 \pm 0.98	2.73 \pm 0.88	2.73 \pm 0.70	2.33 \pm 0.49
PFA1%	2.20 \pm 0.78	2.40 \pm 0.51	2.40 \pm 0.51	2.20 \pm 0.41
PFA4%	2.00 \pm 0.85	1.87 \pm 0.35	1.67 \pm 0.49	1.87 \pm 0.35

Values are means \pm standard deviation.

Table II. Results of the analysis of variance of the effect of individual protocols on the staining quality score, including full-factorial interaction between subjects.

Source of Variation	<i>F</i>	<i>P</i>
Propidium iodide	0.008	0.930
Detergent	0.194	0.660
Fixative solution	27.242	0.000
Propidium iodide x Detergent	2.802	0.096
Propidium iodide x Fixative solution	1.767	0.154
Detergent x Fixative solution	0.215	0.886
Propidium iodide x Detergent x Fixative solution	1.456	0.227

Table III. Effects of the different fixative solutions on the staining quality score.

Fixative Solution	N	Subset			
		1	2	3	4
PFA4%	60	1.85			
PFA1%	60		2.30		
MEtOH	60			2.62	
EtOH	60				3.02

p<0.05, subset 1 vs. subset 2 vs. subset 3 vs. subset 4 (*post hoc* Tukey's HSD test, after ANOVA)

Table IV. Effects of two different concentrations of propidium iodide and detergent on the blastocyst differential cell counts according to the fixative solution used.

Fixative	PI	Detergent	N	ICM cells	TE cells	ICM/TE ratio
EtOH	50 µg/ml	0.5%	10	13.7±6.7	36.9±19.1	0.46±0.28
		1.0%	11	18.5±3.9	47.8±6.6	0.40±0.11
	100 µg/ml	0.5%	13	13.6±5.0	36.1±10.8	0.39±0.14
		1.0%	15	14.7±5.6	49.3±9.5	0.32±0.15
MEtOH	50 µg/ml	0.5%	11	15.0±3.9	33.6±7.1	0.47±0.18
		1.0%	9	11.4±7.9	45.2±7.6	0.26±0.16
	100 µg/ml	0.5%	11	9.9±5.2	43.0±10.3	0.24±0.14
		1.0%	5	10.8±4.2	48.0±7.2	0.23±0.09
PFA1%	50 µg/ml	0.5%	6	15.2±7.9	54.0±34.5	0.34±0.22
		1.0%	6	8.5±6.8	56.0±12.5	0.15±0.10
	100 µg/ml	0.5%	6	6.2±4.6	37.7±7.1	0.16±0.10
		1.0%	3	7.0±4.0	53.0±2.6	0.14±0.08
PFA4%	50 µg/ml	0.5%	5	5.6±2.8	42.8±22.3	0.15±0.08
		1.0%	0	----	----	----
	100 µg/ml	0.5%	0	----	----	----
		1.0%	0	----	----	----

Table V. Multivariate general linear model analysis: individual independent variable's effects and full-factorial interaction between variables.

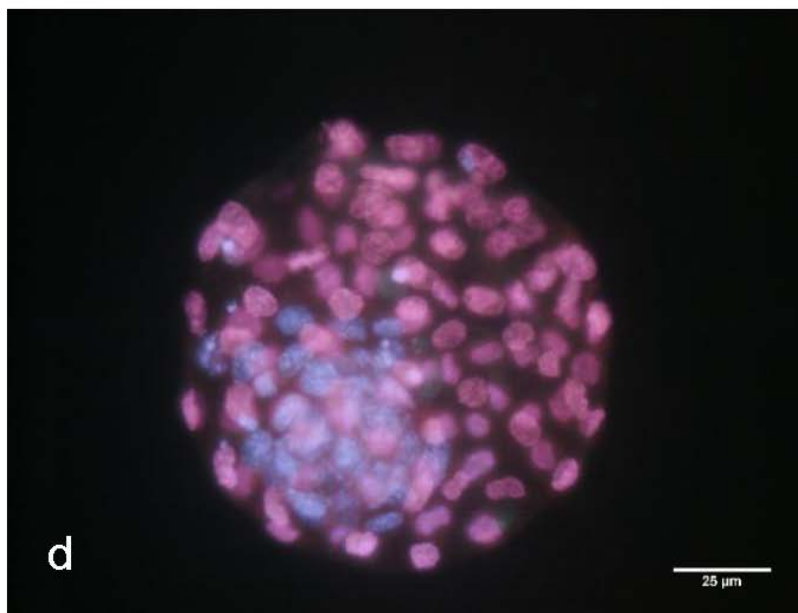
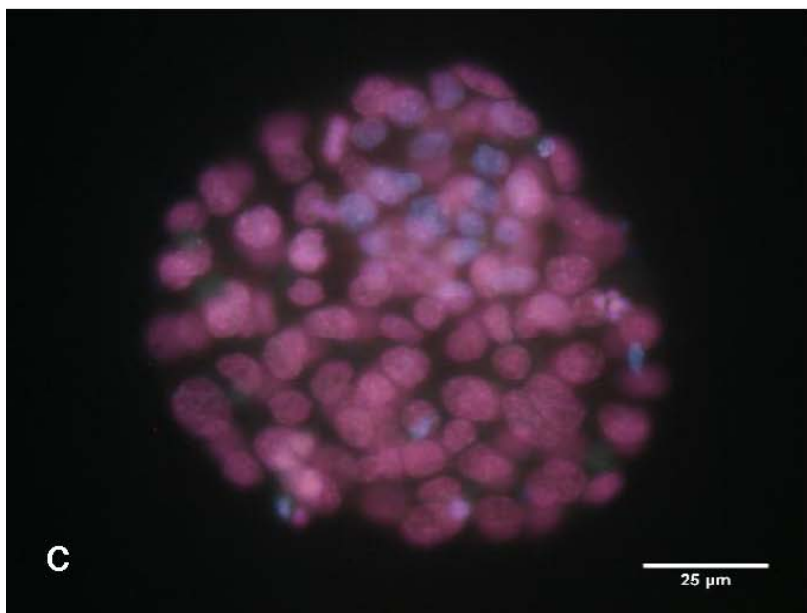
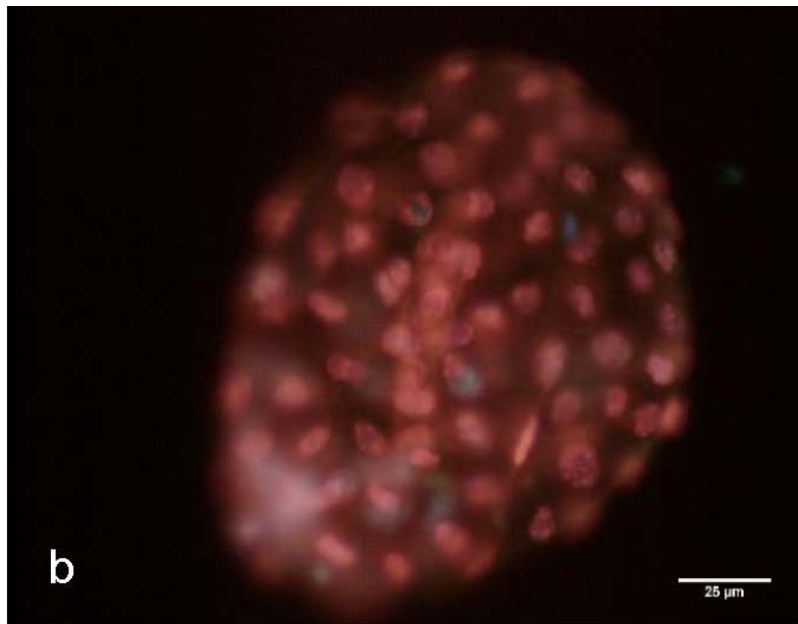
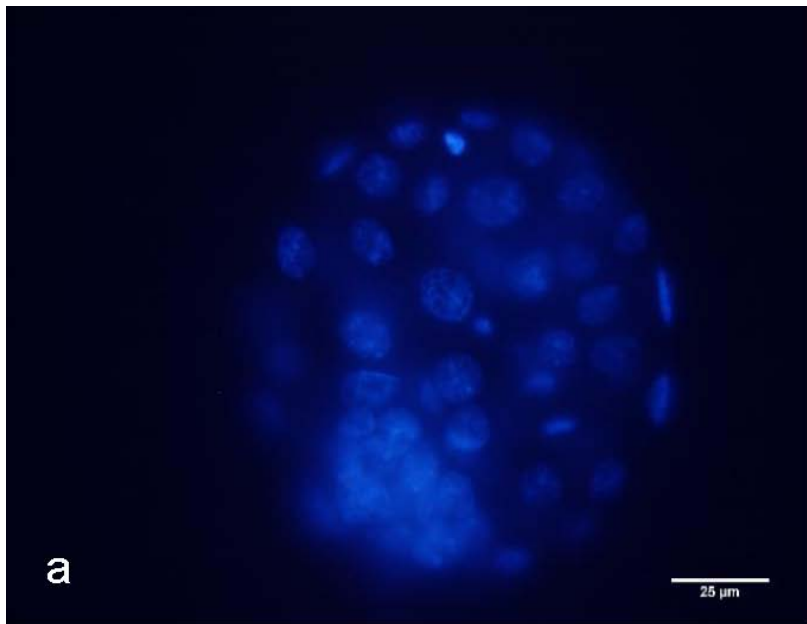
Independent Variable	Pillai's trace	F	P-value	Power
Fixative solution	0.35	4.26	0.000	0.997
Propidium iodide	0.11	3.89	0.01	0.812
Detergent	0.12	4.51	0.005	0.871
Fixative solution x Propidium iodide	0.06	0.95	0.463	0.370
Fixative solution x Detergent	0.09	1.51	0.177	0.576
Propidium iodide x Detergent	0.09	3.01	0.03	0.693
Fixative solution x Propidium iodide x Detergent	0.07	1.21	0.303	0.470

Table VI. Multivariate general linear model analysis: individual independent variable's effects and full-factorial interaction between variables.

Independent Variable	ICM cells		TE cells		ICM/TE ratio	
	<i>F</i>	<i>P</i> -value	<i>F</i>	<i>P</i> -value	<i>F</i>	<i>P</i> -value
Fixative solution	9.849	0.000	1.723	0.167	11.620	0.000
Propidium iodide	7.876	0.006	0.145	0.705	8.319	0.005
Detergent	0.135	0.714	11.285	0.001	8.264	0.005
Fixative solution x Propidium iodide	0.625	0.537	2.079	0.131	0.297	0.744
Fixative solution x Detergent	2.509	0.087	0.228	0.797	0.257	0.774
Propidium iodide x Detergent	1.354	0.247	0.273	0.603	2.997	0.087
Fixative solution x Propidium iodide x Detergent	2.262	0.110	0.842	0.434	1.303	0.276

Figure Legends:

Figure 1. Differential staining quality score of zona-intact mouse blastocysts produced by in vitro fertilization: (a) Score 1: nuclear morphology poorly preserved, most or all nuclei stained by bisbenzimidide (blue); (b) Score 2: nuclear morphology well preserved, nonspecific staining of nuclei by PI (red/pink); (c) Score 3: nuclear morphology well preserved, specific staining but difficulty in differentiating ICM (blue) from TE (pink) nuclei; (d) Score 4: nuclear morphology well preserved, specific staining and easy differentiation of ICM (blue) from TE (pink) nuclei.



7.2. Anexo B

Running Title: Particulate matter and *in vitro* embryo development

***In vitro* fertilization, embryo development, and cell lineage segregation after pre- and/or postnatal exposure of female mice to ambient fine particulate matter**

Mariangela Maluf, M.D.^{a,c}

Paulo Marcelo Perin, M.D.^{a,c}

Daniela Aparecida Nicolosi Foltran Januário, B.Sc.^{b,c}

Paulo Hilário Nascimento Saldiva, M.D., Ph.D.^a

^a Department of Pathology, and ^b Department of Experimental Physiopathology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo; ^c Division of Reproductive Medicine, CEERH – Specialized Center for Human Reproduction, São Paulo, Brazil.

Conflict of interest: none

Financial support: none

Reprint requests: Mariangela Maluf, M.D., Division of Reproductive Medicine, CEERH – Specialized Center for Human Reproduction, R. Pará, n. 50, 12th floor, São Paulo 01243-0020, Brazil (FAX: 55-11-3258-0008; E-mail: mariangela@ceerh.com.br).

Capsule: Pre- and/or postnatal exposure of female mice to ambient fine particulate matter does not affect fertilization or embryo development *in vitro* but impairs cell lineage segregation in the preimplantation blastocyst.

Abstract

Objective: To evaluate effects of pre- and/or postnatal exposure to ambient fine particulate matter on fertilization, embryo development, and cell lineage segregation in preimplantation blastocysts using the IVF mouse model.

Design: Animal model.

Setting: Academic institution.

Animals: Six-week old, superovulated mice.

Intervention(s): Pre- and postnatal exposure to filtered air (FA-FA), filtered-ambient air (FA-AA), or ambient air (AA-AA) in exposure chambers 24h/7 for nine weeks.

Main Outcome Measure(s): Gestation length, litter size, sex ratio, ovarian response to superovulation, fertilization rate, embryo development, blastocyst and hatching rates, total cell count, and proportion of cell allocation to inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE).

Result(s): Gestation length, litter size, litter birth weight, live birth index, and sex ratio were similar among exposure groups. Ovarian response was not affected by the exposure protocol. A multivariate effect for pre- and/or postnatal exposure to ambient fine particulate matter on IVF, embryo development, and blastocyst differential staining was found. Cell counts in ICM and ICM/TE ratios in blastocysts produced in FA-FA protocol were significantly higher than in blastocysts produced in FA-AA and AA-AA protocols. No difference in the total cell count was observed.

Conclusion(s): Our study suggests that the exposure to ambient fine particulate matter of a large urban center may negatively affect female reproductive health by disrupting the lineage specification at the blastocyst stage.

Key words: fine particulate matter, traffic emissions, ambient air, *in vitro* fertilization, embryo development, blastocyst, inner cell mass, trophectoderm, lineage specification, mouse

Introduction

The ubiquitous exposure to traffic emissions present in the ambient air of large metropolitan areas is likely to have a negative impact on human health. Several studies have shown that an episodic short-term increase of ambient air pollution level, a common event in many urban environments, is associated with increased morbidity and mortality from cardiopulmonary causes (1-3). Although the effects of air pollution on respiratory and cardiovascular systems are evident, the influence of air contamination on reproduction is not yet well established. The difficulty to substantiate a clear correlation between traffic emissions and fertility impairment could be related to the multitude of factors involved not only on reproductive competence, which include: age, hormonal and nutritional status, patency of the reproductive tract, gamete reserve and production, heredity, genetic polymorphism, and behavior, as well as on the methodological challenges found in the laboratory to measure and determine this correlation.

In recent years considerable data from epidemiological and experimental studies implied environmental factors as contributors to human infertility. Air pollution has been shown to be associated with decreased fertility and poor outcome such as intrauterine growth retardation, intrauterine mortality, preterm birth, low birth weight, and birth defects (4-8). Very few experimental or clinical studies evaluating possible effects of the exposure to

environmental pollutants on female reproductive health have been conducted (7, 9, 10).

The main contaminants in urban ambient air include carbon monoxide (CO), sulfur dioxide (SO₂), nitrogen dioxide (NO₂), benzene, formaldehyde, polycyclic hydrocarbons, and suspended particulate matter (PM) and may alter fertility through direct and/or indirect effects on different pathways in cellular processes including mitotic interference, altered cell signaling, altered energy sources, enzyme inhibition, mutation, alterations in gene expression, alterations in DNA and RNA synthesis and functioning, and programmed cell death (11) or by disrupting the endocrine and/or immune systems (12, 13). Chemical substances that interfere directly with mitochondrial function may impair oocyte maturation, fertilization, and early embryo development, since mitochondria have different roles on the oocyte, zygote, and pre-compaction cleavage stage embryo processes, including spindle organization and chromosomal segregation, cell cycle timing, and blastocyst compaction, cavitation, and hatching (14). The diminished ATP generating capacity necessary to appropriate cell maintenance could inhibit cytokinesis leading to arrest of cell division and eventual cell death resulting in developmentally incompetent embryos (15). Conversely, other chemicals may act indirectly through receptors causing inappropriate activation (agonist effect) or inhibition (antagonist effect) of normal ligand-induced signaling. The activation of the aromatic hydrocarbon receptors by the exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons released into the environment due to fuel

combustion induces the expression of *Bax*, a pro-apoptotic factor, causing oocyte loss and diminished ovarian reserve and could, at least in part, be related to a decline in ovarian response and premature ovarian failure (16-18). Additionally, some chemicals may act as endogenous hormones blocking or triggering inappropriate hormone activity. Suspended PM with or without any other gaseous component may act as an endocrine-disrupting estrogenic agent and was recently linked to increases in breast, endometrial and ovarian cancer (19).

Evaluation of preimplantational embryos in an *in vitro* fertilization (IVF) and embryo culture system allows observation of the unique events of reproductive and developmental processes that cannot be followed *in vivo*. The possibility of assessing aspects of embryo development *in vitro* such as cell division rate, morphology and quality (regularity, symmetry, fragmentation, multinucleation), rate of progression to the blastocyst stage, rate and pattern of the hatching process, and identification of the first cell lineage segregation in the blastocyst could represent a relevant model for evaluating reproductive effects of exposure (acute or chronic) to ambient air pollution. Nevertheless, observations concerning these effects are limited to studies involving chemical air contamination with different product groups such as anaesthetic gases, refrigerants, hydrocarbons and aromatic compounds in IVF laboratories and their direct impact on early embryo development and pregnancy rates (20, 21).

To our knowledge no studies addressing the impact of exposure to ambient fine PM (PM diameter $\leq 2.5\mu\text{m}$, $\text{PM}_{2.5}$) predominantly derived from traffic emissions on preimplantation embryo development have been reported. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the potential effects of pre- and/or postnatal exposure to ambient $\text{PM}_{2.5}$ on fertilization, embryo development, and cell lineage segregation in preimplantation blastocysts using the IVF mouse model.

Materials and Methods

Animals

Random-bred Swiss Albino mice (School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil) were used for the study. Mice were housed in polycarbonate cages with wood shavings on the floor in a room under controlled environmental conditions of 12-hour light/dark cycles, relative humidity of $50\pm 10\%$ and temperature of $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ for the breeding protocol, and under ambient conditions (temperature, humidity and photoperiod), 24 hours per day, seven days per week during the entire experiment for pre- and postnatal exposure to filtered air (FA) and/or ambient air (AA) protocols. Cage cleaning and bedding changes were done inside the experimental environment every other day. Animals received a supply of balanced commercial food (Nuvital-Nutrients Ltda., Colombo, Paraná, Brazil)

and fresh water *ad libitum*. Protocols used in this study were approved by the ethics committee of the School of Medicine, University of São Paulo, and followed the “Principles of Laboratory Animal Care” published by the U.S. National Institutes of Health.

Exposure Setting and Inhalation Chambers

A detailed description of the exposure system used in this study was published in a previous study from our laboratory (7, 22). The exposure chambers were set up in the gardens of the School of Medicine, University of São Paulo in downtown São Paulo (Brazil), near heavily trafficked streets. The system’s concept is based on the principle of creating a PM level gradient by filtering ambient air sampled from the surroundings. The exposure chambers, assembled side-by-side, are cylindrical aluminum structures measuring 2.0m in diameter and 2.15m high, covered by plastic ultraviolet film. The air intake and distribution occur in the base of the cylinder for uniform dispersion throughout the chamber. Ambient air is forced into the chamber by large fans and exits at the top through a wide opening. Both chambers received ambient air at 20 m³/min. making this essentially a normobaric system: the pressure inside did not exceed that of the outside by more than 3 cm H₂O. In the FA chamber, three stages of filters in hermetically sealed boxes are lined up immediately after the fans. The first stage filter (Model TB; Purafil, São Paulo, São Paulo, Brazil) eliminates large particles and the second (Model JFL-90; Purafil) and third (HEPA filter;

Purafil) trap fine particles. Gaseous pollutants were not retained by the filtering system, thus concentrations of NO₂, SO₂ and CO were assumed to be similar in both chambers.

Ambient Fine Particulate Matter Monitoring

Inside the exposure chambers the 24-hour concentration of PM_{2.5} was determined gravimetrically (23) by collecting particles from polycarbonate filters using Harvard impactors (Air Diagnostics, Harrison, ME) at a flow rate of 10 LPM every other day. The results were expressed as µg/m³. The mean (±SD) concentrations of PM_{2.5} for FA and AA exposure chambers were 6.77±2.03 µg/m³ and 28.93±7.72 µg/m³ during the prenatal period and 7.03±1.87 µg/m³ and 28.97±14.22 µg/m³ during the postnatal period. Pre- and postnatal PM_{2.5} mean concentrations for each exposure chamber showed no difference.

Experimental Design

Figure 1 depicts the study's experimental design. Natural cycling 6 to 8-week old virgin females (n=60) were placed with proven 10-week old breeder males (n=20) to mate naturally in the proportion of three females to each male. Mating was confirmed the following morning by the presence of a vaginal plug (gestation day 0 = day of postcoital plug) and the females were separated from the males. For prenatal exposure the pregnant mice (n=35)

were randomly placed into either FA (n=23) or AA (n=12) chambers, four per cage. As soon as females displayed visual evidence of pregnancy they were checked daily until parturition. Within the first 24 hours after parturition, gestation length, litter size, litter birth weight, live birth index (number of live offspring / number of offspring delivered), and sex of the offspring (determined by anogenital distance) were recorded. At this time, 11 females and offspring from the FA chamber were randomly selected and transferred to the AA exposure chamber (postnatal exposure). The remaining 24 females and offspring were kept in their original location. After weaning the animals were separated and only females born under experimental conditions continued in the chambers, four per cage. The study is comprised of three different experimental groups: 1) Pre- and postnatal exposure to filtered air (FA-FA group, n=40); 2) Prenatal exposure to filtered air and postnatal exposure to ambient air (FA-AA group, n=36); 3) Pre- and postnatal exposure to ambient air (AA-AA group, n=36). After six weeks of postnatal exposure all females were superovulated as described below and killed by cervical dislocation immediately before oocyte collection.

In Vitro Fertilization and Embryo Culture

IVF and embryo culture were performed according to procedures previously described (24). Briefly, different culture media were used for each IVF step: a) collection of oocytes from oviducts and isolation of the cauda epididymis and vas deferens (collection medium), modified human tubal fluid (mHTF no.

90126; Irvine Scientific, Santa Ana, CA) prewarmed to 37°C; b) sperm capacitation and IVF (insemination medium), human tubal fluid (HTF no. 90125; Irvine Scientific) containing 10% serum substitute supplement (SSS no. 99193; Irvine Scientific); c) embryo culture, potassium-enriched simplex optimized medium (KSOM) with glucose and amino acids (no. MR-107; Specialty Media, Chemicon, Phillipsburg, NJ) supplemented with 5 mg/ml of human serum albumin (HSA-solution no. 10064; Vitrolife AB, Gothenburg, Sweden). Insemination and embryo culture media were overlaid with embryo-tested mineral oil (Oil for Embryo Culture no. 9305; Irvine Scientific) and equilibrated overnight in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C. The same batch of each culture medium was used in all experiments. For each exposure group oocytes were obtained from 6-week old mice using intraperitoneal injection of 10 IU of equine chorionic gonadotrophin (eCG, Folligon® 1,000 IU; Intervet International, São Paulo, São Paulo, Brazil) followed 48 hours later by intraperitoneal injection of 10 IU of human chorionic gonadotrophin (hCG, Choragon® 5,000 IU; Ferring, São Paulo, São Paulo, Brazil). Females were killed 14 to 16 hours after hCG administration. Ovulated oocytes were released from the ampullar oviduct and placed into insemination medium. To obtain sperm, proven 10-week old breeders were killed 12 to 13 hours after the females were injected with hCG and the cauda epididymis and vas deferens were removed from each testis and placed in insemination medium. Spermatozoa were gently squeezed out of the epididymis using a watchmaker's forceps and residual caudal tissue was discarded. Capacitation was allowed to proceed for 60 to 90 minutes at

37°C in 5% CO₂. IVF and embryo culture were performed in an HEPA-VOC filtration system incubator (Series II Water Jacketed Incubator, Model 3110; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Sperm and oocytes were mixed and incubated for four to six hours. Fertilized oocytes from each female were allotted in groups of 10 and cultured in 20µl drops of embryo culture medium for 120 hours.

Embryo Evaluation

Examination was done on the heated stage (~37°C) of an inverted microscope at X200 magnification (Eclipse TE2000-U with Hoffman modulation contrast; Nikon, Melville, NY) 6, 96 and 120 hours after insemination (days 1, 4 and 5, respectively). Fertilization assessment was carried out 6 to 8 hours after insemination. Oocytes presenting two pronuclei (2PN) and two polar bodies were considered normally fertilized. On days 4 and 5 embryo morphology, developmental progress, number of embryos reaching blastocyst stage (the blastocoel occupies at least 80% of total embryo volume) and number of blastocysts that at least started hatching were recorded. Blastocyst morphology classification was based on criteria described by Gardner and Lane (25). The hatching status of blastocysts identified on days 4 and 5 was graded on a 4-point scale from 0 to 3, where 0 = zona enclosed, 1 = initially (herniation of zona pellucida by less than 50% of the embryo), 2 = partially (herniation of zona pellucida by at least 50% of the embryo), and 3 = completely hatched blastocysts. A weighted hatching

score representing the sum of the hatching status grade of every blastocyst divided by the total number of blastocysts was calculated for evaluations at 96 and 120 hours post insemination (*Score96* and *Score120*, respectively) for each female. The present system awards a total possible score of 3 for each evaluation day. A discriminatory scoring system (*D Score*) was then developed to identify the developmental potential between evaluations of the cohort of blastocysts from each female. The *D Score* was weighted by the equation:

$$D \text{ Score} = ((\text{Score}120/3) + (\text{Score}96/3)) - ((\text{Score}120 - \text{Score}96)/6)$$

The rationale behind this system was to balance the hatching status and the developmental potential of blastocysts in order to facilitate the separation of females with cohorts of blastocysts presenting similar hatching status but different developmental potential. This scoring system produces a maximum score of $((3/3) + (3/3)) - ((3-3)/6) = 2$.

Differential Inner Cell Mass and Trophectoderm Cell Counts

By day 5 of culture (120 hours after insemination), differential cell counts of the inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) of three blastocysts produced *in vitro*, randomly selected from each female mouse were determined by a modification in a method described by Thouas *et al.* (2001) (26). Intact blastocysts (groups of 3 to 5) were incubated for approximately

10 seconds (or until TE visibly change color) in 500 μ L of HTF medium containing 50 μ g/mL propidium iodide (PI; Chemicon) and 1% Triton X-100 (TX-100; Sigma, St. Louis, MO). The blastocysts were then transferred to fixative solution containing 25 μ g/mL of bisbenzimidazole (H33258; Hoechst AG, Frankfurt, Germany) and 100% ethanol (ethanol PA no. 1.00983.1000; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), and stored overnight at 4°C. Fixed and stained blastocysts were then transferred into glycerol, individually placed on glass microscope slides under coverslips and visualized for cell counting. Counting was performed from digital photographs of images obtained on an epifluorescence microscope (Eclipse 90i; Nikon, Melville, NY) fitted with a mercury lamp and excitation filters (460 nm for blue and red fluorescence, and 560 nm for red only). An observer blind to experimental protocols performed all cell counts.

Statistical Analysis

The experimental unit was an individual female mouse for the assessment of either the reproductive success and the morphological development of zygotes produced by in vitro fertilization, according to the pre- and postnatal exposure to FA and/or AA. Gestation length, litter size, litter birth weight, live birth index (number of live offspring / number of offspring delivered), and sex ratio (Male / Female + Male) variables were analyzed using two-sample Hotelling's T² test assuming homogeneity of variance by Bartlett-Box test. The genetic variability of the mice used in this study determined different

patterns of ovarian response to superovulation which were identified and grouped through the K-means cluster analysis method performed on the number of oocytes retrieved and inseminated as poor (centroids: 25.4 ± 10.7 and 15.8 ± 13.6 , respectively), moderate (centroids: 61.5 ± 11.1 and 56.6 ± 10.0 , respectively), or high (centroids: 105.5 ± 19.8 and 89.9 ± 16.8 , respectively) responders. Thus ovarian response was analyzed as a categorical independent variable to evaluate its effect on each experimental group. Categorical data regarding ovarian response to superovulation in each experimental group were evaluated using a chi-square test. For the assessment of the morphological development of zygotes *in vitro*, the experimental unit was the mean number of zygotes per female mouse. However, only the drops of culture medium containing all the 10 zygotes were included in the analysis. The dependent variables for this assessment included: number of zygotes, fertilization rate, number of blastocysts and of blastocysts that at least started hatching at 96 and 120 hours after insemination, blastocyst formation and hatching rates at 96 and 120 hours after insemination, *D Score*, total cell count and number of ICM and TE cells of intact blastocysts that had developed from zygotes 120 hours after insemination. All percentage data were subjected to arcsine transformation. The effects of pre and/or postnatal ambient $PM_{2.5}$ exposure and ovarian response on each dependent variable were evaluated performing a multivariate analysis of variance (MANOVA). The Tukey HSD *post hoc* test was used for all comparisons of individual dependent variables between groups. Distribution of the cell populations was displayed using notched

boxplots. A computer-generated list of random numbers was used whenever randomization was necessary. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). The data were analyzed using Statistics Package for Social Sciences version 13.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL).

Results

Animal Exposure to Filtered or Ambient Air and Breeding

Table 1 shows the reproductive performance of pregnant mice exposed to either AA or FA. Gestation length, litter size, litter birth weight, live birth index, and sex ratio did not differ significantly between exposure groups.

Ovarian Response to Superovulation After Pre- and/or Postnatal Exposure to Ambient Air

Ovarian response to superovulation was absent in 20.0%, 16.7% and 22.2% of the mice in groups FA-FA, FA-AA, and AA-AA, respectively. The distribution of the different patterns of ovarian response to superovulation was not affected by the pre- and/or postnatal exposure of the female mice to ambient air (Table 2).

In Vitro Fertilization, Embryo Development, and Differential Nuclear Staining

Means (\pm SD) for all *in vitro* embryonic development variables according to ovarian response pattern for each exposure group are reported in Table 3.

Effects of the Ovarian Response

A multivariate effect for ovarian response on *in vitro* fertilization and embryo development and on blastocyst cell segregation was found (Pillai's trace = 0.60; $F = 2.23$; $p = 0.001$; power = 0.998). The univariate analysis of the effect of the ovarian response on each parameter of *in vitro* fertilization and embryo development to the blastocyst stage is shown in Table 4. The ovarian response pattern revealed a significant effect on fertilization and fertilization rate, on the zygotes that reached blastocyst stage by 96 and 120 hours after insemination, and on the hatching process of blastocysts by days 4 and 5 after insemination but did not reveal any significant difference among the patterns in the discriminatory score. *Post hoc* comparison of embryonic developmental parameters by ovarian response pattern showed significant differences between the patterns. A significant impairment of *in vitro* fertilization, embryo development up to blastocyst stage, and hatching process at the level of $p < 0.05$ was observed in the high response subgroup when compared to moderate and poor response subgroups (Table 5). MANOVA revealed no significant effects on total cell count, ICM cells, TE cells, or the ICM/TE ratio by ovarian response pattern as shown in Table 4.

Effects of the Exposure to Ambient Air

A multivariate effect for pre- and/or postnatal exposure to ambient air on *in vitro* fertilization and embryo development and on blastocyst cell segregation was found (Pillai's trace = 0.62; $F = 2.40$; $p = 0.001$; power = 0.999). The univariate analysis of the effect of the exposure protocol on each parameter of *in vitro* fertilization and embryo development to blastocyst stage is shown in Table 4. No significant differences except for the blastocyst rate at 120 hours after insemination were found for any exposure protocol in the univariate analysis. *Post hoc* comparison of the blastocyst rate by day 5 of culture showed a significantly lower result for FA-FA group when compared to FA-AA and AA-AA groups (Table 6). Figure 2 shows distribution of the total number of cells, cells in the ICM and TE, and the ratio of ICM to TE cells of blastocysts originated from oocytes fertilized *in vitro*, obtained from females exposed pre- and/or postnatally to filtered and/or ambient air. The univariate analysis of the effect of the exposure protocol on each parameter of blastocyst cell segregation is shown in Table 4. Allocation of ICM and TE cells for each exposure protocol is shown in Figure 3. The exposure protocol revealed a significant effect on ICM cell count, TE cell count, and on the ICM/TE ratio but no significant difference among the exposure protocols in total cell count. *Post hoc* comparison of the blastocyst cell segregation parameters by the exposure protocol showed significant differences between groups. The cell counts in the ICM and the ICM/TE ratios in blastocysts produced in the FA-FA protocol were significantly higher ($p < 0.05$) than in

blastocysts produced in the FA-AA and AA-AA protocols. However, cell counts in the TE in blastocysts produced in FA-FA protocol were significantly lower ($p < 0.05$) than in blastocysts produced in the FA-AA and AA-AA protocols (Table 6).

Table 4 shows that no significant ovarian response \times exposure protocol interaction on *in vitro* fertilization and embryo development was observed (Pillai's trace = 0.45; $F = 0.70$; $p = 0.940$; power = 0.831).

Discussion

The experimental data provide robust evidence that the exposure to PM_{2.5} predominantly derived from traffic emissions and present in urban ambient air disrupts the allocation pattern of the first two cell lineages at the blastocyst stage, as evidenced by the reduction in ICM cell number and in the ICM/TE ratio without interfering in the early development of mouse embryos. The total cell number of blastocysts was not affected by the exposure indicating that cell segregation was deviated to TE cell lineage. Moreover, a similar pattern of lineage specification at the blastocyst stage observed for embryos from mice pre- and/or postnatally exposed to PM_{2.5} suggests that the prenatal exposure to ambient air does not enhance the disruption of lineage specification in blastocysts, indicating that this effect could be specifically linked to postnatal exposure. Ovarian response to gonadotrophin stimulation was analyzed as an independent variable due to the genetic variability of the

mouse strain selected in order to minimize its influence as a possible confounding factor. Our data showed that the ovarian response pattern did not affect cell fate specification in blastocysts, though it has a negative impact on preimplantation embryo development as evidenced by the significant impairment of *in vitro* fertilization and embryo development observed in the high response group when compared to moderate and poor response subgroups. Cell lineage specification at the blastocyst stage, rather than early embryo development, can be proposed as a biomarker for monitoring effects of PM_{2.5} exposure on female reproductive health in experimental studies.

Despite the considerable amount of scientific knowledge focused on the correlation between exposure to urban air pollution and human health, few studies addressed the specific question whether urban air pollution can have a significant impact on female reproductive function (7, 13, 27). A previous study evaluated the effects of chronic exposure to air pollution in a large urban center on the fertility of Balb/c female mice (7). The analysis of the reproductive endpoints revealed a significant decrease in the number of viable fetuses, an increase in the number of implantation failures, and a slight decline in the male to female ratio at birth in the exposed group. Number of pregnancies, fetal deaths, and fetal and placental weight showed no difference between groups. The authors concluded that although their study design did not allow identification of the factors involved in the pathogenesis of the fertility reduction promoted by exposure to air pollution, findings

demonstrated female reproductive health to be a target for air pollutants. Even though the reproductive outcome of pregnant mice exposed to PM_{2.5} was not a primary endpoint of our study, the results showed that gestation length, litter size, litter birth weight, litter birth index, and sex ratio did not differ significantly between exposure groups, a partial disagreement with the previous study. The differences observed could be attributed to our study design, in which a distinct mouse strain and different exposure period were employed.

The lower reproductive performance in mice exposed to air pollution previously observed (7, 28) prompted us to further investigate a possible effect of metro area ambient PM_{2.5} on preimplantational embryo development to get a clear understanding of the mechanism through which air pollution could negatively affect reproduction. In the current experiment we found that a lineage specification defect in blastocysts, rather than impairment of the fertilization process or early embryo development, may provide a clue to further clarify the reason why adverse reproductive outcome is observed in mice exposed to PM_{2.5} predominantly derived from traffic emissions present in ambient air. Although the blastocyst rate by day 5 of culture showed significantly higher results for mice exposed either pre- and/or postnatally to PM_{2.5}, the mean number of zygotes that reached the blastocyst stage at 120 hours was similar among the exposure protocols. This observation is difficult to interpret but could possibly reflect the lower number of zygotes that

reached the blastocyst stage by day 5 of culture in the poor responder group of mice exposed to filtered air.

The formation of the blastocyst results from the functional differentiation of embryonic cells into two distinct lineages, the ICM cells that bring about all embryonic tissues and part of the extraembryonic membranes and the TE cells that contribute mainly to the formation of the fetal placenta (29). Both cell lineages and their ratio have a fundamental role in embryo survival and fetal viability and the blastocyst has the tools necessary to control the specification of those cell lineages within a relatively narrow range (30). Experimental and clinical studies showed a positive relationship between ICM cell number and morphology and the rate of embryo implantation (31-33). There is convincing evidence that an imbalance in blastocyst cell lineage differentiation may compromise the subsequent post-implantation developmental potential of the embryo (30, 34). Additionally, due to differences in cell positioning and metabolic requirements, ICM and TE cell lines have differential susceptibility to embryotoxic agents, and in most instances ICM cells appear less resistant to disruption than TE cells (35). In our results pre- and/or postnatal exposure to ambient PM_{2.5} predominantly derived from traffic emissions resulted in a significant decrease in ICM cell count and in the ICM/TE ratio. Based on this finding we could hypothesize that the significant decrease in the ICM cell population as a result of unbalanced allocation of cells during specification of the blastocyst lineages could represent the biological mechanism whereby ambient PM_{2.5} might

influence pregnancy viability. However, the pathway by which $PM_{2.5}$ predominantly derived from traffic emissions decreases the number of ICM cells and increases the number of TE cells is still unknown and needs clarification.

The molecular regulation of cell lineage specification at the blastocyst stage is still not fully understood. Yet, the differentiation between ICM and TE cell lineages can be made through the identification of lineage-specific transcription factors. Oct4, a POU domain protein, and Nanog, a homeobox gene, have their expression restricted to the ICM after blastocyst formation. Cdx2, a caudal-type homeodomain transcription factor, is specifically expressed in TE cells at the blastocyst stage. Oct4 and Cdx2 negatively regulate the expression of each other to allow proper segregation of ICM and TE lineages required for normal blastocyst development (29, 36). Based on these observations and on the results of our study showing a disruption of lineage specification in the blastocyst we may further speculate that the exposure to ambient $PM_{2.5}$ may alter the balance between Oct4 and Cdx2 expression compromising integrity and function of the different cell lineages, and eventually embryonic and fetal viability.

The decision to analyze the effects of pre- and/or postnatal exposure to ambient $PM_{2.5}$ on the ovarian response was based on clinical studies showing that smoking may accelerate ovarian follicular depletion, leading to a significant reduction in the ovarian reserve and poorer response to ovarian

stimulation at an earlier age (37-39). Even though the mechanisms involved in the detrimental reproductive effect of smoking were not the same as those from the exposure to air pollution, they may share similar pathways. Our data showed that the distribution of the different patterns of ovarian response to superovulation was not affected by pre- and/or postnatal exposure of female mice to ambient PM_{2.5}. This finding suggests that either the exposure to PM_{2.5} may not affect ovarian reserve or if affected it may have no clinical significance in young female mice.

The strengths of our study were the use of an experimental design that enabled us to create an exposure protocol representative of a real world situation present in any large urban center and the observation that lineage specification at the blastocyst stage, despite the genetic variability of the mouse strain selected and consequent unevenness of ovarian response, was the only developmental parameter affected by exposure to air pollution, suggesting it might be a helpful biomarker for monitoring the effects of PM_{2.5} exposure on female reproductive health in experimental studies. The study design has some limitations that should be addressed. First, since the gaseous pollutants were not retained by the filtering system and, thus, the concentration of NO₂, SO₂ and CO were assumed to be similar in both chambers, we should not specifically attribute the reproductive toxicity to PM_{2.5} because its physical and chemical interaction with the gaseous pollutants could modify this effect. However, epidemiological studies evaluating the role of ambient O₃, NO₂, SO₂ and CO as confounders of

ambient PM_{2.5} health effects showed that the use of multiple pollutant models in these studies may not be suitable and that the health effects attributed to the ambient gases may actually be a result of exposure to ambient PM_{2.5}, a reasonable surrogate of personal PM_{2.5} exposure (40, 41). Second, although we found biological evidence that suggests the mechanism through which air pollution might negatively influence pregnancy viability, we did not further investigate this assumption by transferring blastocysts produced in each exposure protocol to pseudopregnant mice. The answer to this limitation can only be obtained by new studies evaluating the effect of exposure to ambient air on the *in vitro* preimplantation and *in vivo* postimplantation embryo development.

In conclusion, to our knowledge this study provides the first evidence that exposure to PM_{2.5} predominantly derived from traffic emissions and present in ambient air of a large urban center may negatively affect murine reproductive health by disrupting the allocation pattern of the first two cell lineages at the blastocyst stage. Based on this observation and on the fact that a significant reduction of the ICM cell population is incompatible with a normal embryo development after implantation, our results suggest that the differential sensitivity of ICM and TE cells to air pollution may contribute to the poorer reproductive outcome. Differential cell staining at the blastocyst stage can be proposed as a biomarker for monitoring the effects of air pollution on female reproductive health in experimental studies. The extrapolation of these observations to the clinical arena has important

implications for the reproductive health status of women living in large urban areas where they are subject to long-term, repeated exposure to PM_{2.5}.

Acknowledgments

The authors wish to thank Alessandro M. Mazzoni, B.Sc., Ph.D. for assistance in statistical analysis.

References

1. Pope C. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? *Environ Health Perspect* 2000;108(Suppl 4):713-23.
2. Martins L, Latorre M, Saldiva P, Braga A. Air pollution and emergency room visits due to chronic lower respiratory diseases in the elderly: an ecological time-series study in São Paulo, Brazil. *J Occup Environ Med* 2002;44:622-7.
3. Rich D, Mittelman M, Schwartz J, Luttmann-Gibson H, Catalano P, Speizer F *et al*. Increased risk of paroxysmal atrial fibrillation episodes associated with acute increases in ambient air pollution. *Environ Health Perspect* 2006;114:120-3.
4. Pereira L, Loomis D, Conceição G, Braga A, Areas R, Kishi H *et al*. Association between air pollution and intrauterine mortality in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect* 1998;106:325-9.
5. Ritz B, Yu F, Fruin S, Chapa G, Shaw G, Harris J. Ambient air pollution and risk of birth defects in Southern California. *Am J Epidemiol* 2002;155:17-25.
6. Lee B, Ha E, Park H, Kim Y, Hong Y, Kim H *et al*. Exposure to air pollution during different gestational phases contributes to risks of low birth weight. *Hum Reprod* 2003;18:638-43.
7. Mohallem S, Lobo D, Pesquero C, Assunção J, Andre P, Saldiva P *et al*. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. *Environ Res* 2005;98:196-202.
8. Rubes J, Selevan S, Evenson D, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z *et al*. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod* 2005;20:2776-83.
9. Carpenter D, Shen Y, Nguyen T, Le L, Lininger L. Incidence of endocrine disease among residents of New York areas of concern. *Environ Health Perspect* 2001;109(Suppl 6):845-51.

10. Tomei G, Ciarrocca M, Fortunato B, Capozzella A, Rosati M, Cerratti D *et al.* Exposure to traffic pollutants and effects on 17-beta-estradiol (E2) in female workers. *Int Arch Occup Environ Health* 2006;80:70-7
11. Faustman E, Gohlke J, Ponce R, Lewandowski T, Seeley M, Whittaker S *et al.* Experimental approaches to evaluate mechanisms of developmental toxicity. In: Hood R, ed. *Developmental and Reproductive Toxicology A Practical Approach*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC, 2006:15-60.
12. Hoyer P. Ovarian toxicity in small pre-antral follicles. In: Hoyer P, ed. *Ovarian Toxicology*. Boca Raton CRC Press, 2004:17-39.
13. Younqlai E, Holloway A, Foster W. Environmental and occupational factors affecting fertility and IVF success *Hum Reprod Update* 2005;11:43-57.
14. Thouas G, Trounson A, Jones G. Developmental effects of sublethal mitochondrial injury in mouse oocytes. *Biol Reprod* 2006;74:969-77.
15. Navarro P, Liu L, Keefe D. In vivo effects of arsenite on meiosis, preimplantation development, and apoptosis in the mouse. *Biol Reprod* 2004;70:980-5.
16. Matzuk M. Eggs in the balance. *Nat Genet* 2001;28:300-1.
17. Takai Y, Canning J, Perez G, Pru J, Schlezinger J, Sherr D *et al.* Bax, caspase-2, and caspase-3 are required for ovarian follicle loss caused by 4-vinylcyclohexene diepoxide exposure of female mice in vivo. *Endocrinology* 2003;144:69-74.
18. Matikainen T, Perez G, Juriscova A, Pru J, Schlezinger J, Ryu H *et al.* Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet* 2001;28:355-60.
19. Iwai K, Mizuno S, Miyasaka Y, Mori T. Correlation between suspended particles in the environmental air and causes of disease among inhabitants: cross-sectional studies using the vital statistics and air pollution data in Japan. *Environ Res* 2005;99:106-17.
20. Cohen J, Gilligan A, Esposito W, Schimmel T, Dale B. Ambient air and its potential effects on conception in vitro. *Hum Reprod* 1997;12:1742-9.
21. Hall J, Gilligan A, Schimmel T, Cecchi M, Cohen J. The origin, effects and control of air pollution in laboratories used for human embryo culture. *Hum Reprod* 1998;13(Suppl 4):146-55.
22. Lemos M, Mohallen S, Macchione M, Dolhnikoff M, Assunção J, Godleski J *et al.* Chronic Exposure to Urban Air Pollution Induces Structural Alterations in Murine Pulmonary and Coronary Arteries. *Inhalation Toxicology* 2006;18:247-53.
23. Hinds W, ed. *Aerosol Technology: Properties, Behaviour, and Measurement of Airborne Particles*. Second ed. New York: Wiley-Interscience, 1999.
24. Perin P, Maluf M, Januario D, Saldiva P. Comparison of the efficacy of two commercially available media for culturing one-cell embryos in the in vitro fertilization (IVF) mouse model. *Fertil Steril* In press.
25. Gardner D, Lane M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod* 1993;48:377-85.

26. Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophoctoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod BioMed Online* 2001; 3:25-9.
27. Foster W. Environmental toxicants and human fertility. *Minerva Ginecol* 2003;55:451-7.
28. Silva I, Lichtenfels A, Saldiva P. Increase abortion in mice exposed to environmental air pollution in Sao Paulo. *Fertil Steril* 2005;84(Suppl 1):S404-5.
29. Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson R, Rossant J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn* 2006;235:2301-14.
30. Fleming T, Kwong W, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A *et al.* The embryo and its future. *Biol Reprod* 2004;71:1046-54.
31. Lane M, Gardner D. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil* 1997;109:153-64.
32. Richter K, Harris D, Daneshmand S, Shapiro B. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril* 2001;76:1157-67.
33. Kovacic B, Vlasisavljevic V, Reljic M, Sajko M. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2004;8:687-94.
34. Koo D, Kang Y, Choi Y, Park J, Kim H, Oh K *et al.* Aberrant allocations of inner cell mass and trophoctoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol Reprod* 2002;67:487-92.
35. Pampfer S. Apoptosis in rodent peri-implantation embryos: differential susceptibility of inner cell mass and trophoctoderm cell lineages - a review. *Placenta* 2000;21(Suppl A):S3-10.
36. Strumpf D, Mao C, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F *et al.* Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophoctoderm in the mouse blastocyst. *Development* 2005;132:2093-102.
37. Nemr A, Shawaf T, Sabatini L, Wilson C, Lower A, Grudzinskas J. Effect of smoking on ovarian reserve and ovarian stimulation in in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1998;13:2192-8.
38. Messerlian G, Harlow B. The influence of depression, body mass index, and smoking on serum inhibin B levels in late reproductive-aged women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91:1496-500.
39. Mlynarcikova A, Fickova M, Scsukova S. Ovarian intrafollicular processes as a target for cigarette smoke components and selected environmental reproductive disruptors. *Endocrine Regulations* 2005;39:20-31.
40. Sarnat J, Koutrakis P, Suh H. Assessing the relationship between personal particulate and gaseous exposures of senior citizens living in Baltimore, MD. *J Air Waste Manag Assoc* 2000;50:1184-98.
41. Sarnat J, Schwartz J, Catalano P, Suh H. Gaseous pollutants in particulate matter epidemiology: confounders or surrogates? *Environ Health Perspect* 2001;109:1053-61.

Table 1. Assessment of reproductive variables at the time of birth in Swiss Albino pregnant mice according to prenatal exposure to filtered (FA) or ambient (AA) air.

Reproductive Variable	FA Exposure	AA Exposure
Gestation length (days)	24.09±2.66	23.91±2.39
Litter size	9.43±2.94	8.92±3.29
Litter birth weight (g)	1.73±0.03	1.72±0.01
Live birth index	0.95±0.09	0.96±0.07
Sex ratio (M/M+F)	0.58±0.18	0.62±0.18

$T^2 = 8.194$, $p = 0.218$

Table 2. Ovarian response of superovulated Swiss Albino female mice after pre- and postnatal exposure to filtered (FA) and/or ambient (AA) air.

Response	FA-FA Exposure	FA-AA Exposure	AA-AA Exposure
Absent	8	6	8
Low	8	6	8
Moderate	13	18	10
High	11	6	10
Total	40	36	36

$X^2=4.507$, $p=0.608$

Table 3. Effects of pre- and postnatal exposure of female mice to filtered (FA) and/or ambient (AA) air on embryo development and lineage specification according to ovarian response. For explanation of the discriminatory score (*D Score*), see text.

Dependent Variable	FA-FA Exposure			FA-AA Exposure			AA-AA Exposure		
	Poor Responder	Moderate Responder	High Responder	Poor Responder	Moderate Responder	High Responder	Poor Responder	Moderate Responder	High Responder
Zygote	9.64±0.69	9.16±0.81	8.92±0.75	9.12±0.94	9.53±0.56	8.71±0.84	9.47±0.68	9.29±0.59	8.77±0.78
Fertilization rate	0.96±0.07	0.92±0.08	0.89±0.08	0.91±0.09	0.95±0.06	0.87±0.08	0.95±0.07	0.93±0.06	0.88±0.08
Blastocyst (96h)	7.21±3.13	7.11±1.96	6.24±2.40	8.47±0.91	7.87±1.47	6.10±2.70	8.44±1.25	7.74±1.46	6.90±1.57
Blastocyst rate (96h)	0.73±0.32	0.77±0.19	0.69±0.26	0.92±0.06	0.83±0.15	0.68±0.28	0.89±0.12	0.84±0.15	0.78±0.15
Hatching (96h)	4.62±2.59	4.03±2.21	2.79±1.68	4.76±2.82	4.13±2.02	2.59±2.25	5.44±1.65	4.06±1.82	4.28±1.69
Blastocyst (120h)	8.33±2.99	8.34±1.12	7.36±1.96	9.00±0.88	8.89±0.78	7.46±2.33	9.33±0.83	8.72±0.77	7.86±0.98
Blastocyst rate (120h)	0.85±0.29	0.91±0.10	0.82±0.19	0.98±0.02	0.93±0.06	0.84±0.22	0.98±0.02	0.94±0.07	0.89±0.06
Hatching (120h)	7.80±2.82	7.51±1.39	6.36±2.07	8.65±0.75	8.21±1.10	6.62±2.53	8.31±1.00	7.75±0.83	7.02±1.25
<i>D Score</i>	0.63±0.23	0.61±0.22	0.50±0.16	0.66±0.26	0.62±0.19	0.46±0.23	0.67±0.20	0.61±0.20	0.67±0.16
Total cell count	118.0±15.5	122.7±11.5	120.3±11.4	128.7±10.2	129.8±11.7	117.2±7.5	121.2±15.6	120.8±13.4	116.9±11.8
ICM cells	29.3±5.5	30.7±8.1	29.9±4.8	24.6±5.0	24.6±5.8	23.9±6.2	23.9±4.0	23.0±6.9	25.3±2.2
TE cells	88.7±11.2	92.0±9.6	90.4±10.6	104.2±9.7	105.2±10.2	93.2±9.8	97.3±15.2	97.8±10.6	91.6±11.5
ICM/TE ratio	0.33±0.04	0.34±0.09	0.33±0.06	0.23±0.06	0.24±0.06	0.27±0.08	0.25±0.06	0.24±0.08	0.28±0.04

Values are means ± standard deviation.

Table 4. Multivariate general linear model analysis: individual independent variables' effects and full-factorial interaction between variables.

Dependent Variable	Group		Response		Group x Response	
	<i>F</i>	<i>P</i> -value	<i>F</i>	<i>P</i> -value	<i>F</i>	<i>P</i> -value
Zygote	0.196	0.823	5.461	0.006	1.058	0.383
Fertilization rate	0.135	0.874	8.311	0.001	1.518	0.205
Blastocyst (96h)	1.505	0.228	4.599	0.013	0.301	0.877
Blastocyst rate (96h)	2.297	0.107	5.084	0.008	0.518	0.723
Hatching (96h)	1.280	0.284	4.065	0.021	0.511	0.727
Blastocyst (120h)	1.382	0.257	5.848	0.004	0.205	0.935
Blastocyst rate (120h)	4.074	0.021	8.792	0.000	0.847	0.499
Hatching (120h)	1.110	0.335	6.540	0.002	0.195	0.940
<i>D</i> Score	1.078	0.345	1.745	0.181	0.850	0.498
Total cell count	1.516	0.226	2.023	0.139	0.739	0.568
ICM cells	9.421	0.000	0.041	0.960	0.254	0.906
TE cells	6.100	0.003	2.845	0.064	0.815	0.519
ICM/TE ratio	13.967	0.000	1.008	0.370	0.351	0.842

Table 5. Effects of ovarian response pattern to superovulation on the *in vitro* fertilization and embryo development of Swiss Albino mice.

Dependent Variable	Subset 1		Subset 2	
	Response	Mean±SD	Response	Mean±SD
Zygote	Low	9.44±0.76	High	8.81±0.75
	Moderate	9.36±0.66		
Fertilization rate	Low	0.94±0.08	High	0.88±0.08
	Moderate	0.94±0.07		
Blastocyst (96h)	Low	8.00±2.09	High	6.45±2.14
	Moderate	7.60±1.63		
Blastocyst rate (96h)	Low	0.81±0.16	High	0.72±0.22
	Moderate	0.84±0.22		
Hatching (96h)	Moderate	4.08±1.99	Low	4.96±2.28
	High	3.30±1.91		
Blastocyst (120h)	Low	8.88±1.90	High	7.57±1.70
	Moderate	8.68±0.91		
Blastocyst rate (120h)	Low	0.93±0.18	High	0.85±0.16
	Moderate	0.93±0.08		
Hatching (120h)	Low	8.22±1.80	High	6.66±1.87
	Moderate	7.88±1.16		

p<0.05, subset 1 vs. subset 2 (*post hoc* Tukey's HSD test, after MANOVA)

Table 6. Effects of pre- and postnatal exposure to filtered (FA) and/or ambient (AA) air on Swiss Albino mouse lineage specification at the blastocyst stage. Exposure protocols with mean values of dependent variables showing no difference between them were grouped in homogeneous subsets.

Dependent Variable	Subset 1		Subset 2	
	Exposure	Mean±SD	Exposure	Mean±SD
Blastocyst rate (120h)	FA-AA	0.92±0.11	FA-FA	0.86±0.19
	AA-AA	0.94±0.07		
Inner Cell Mass (ICM)	FA-AA	24.45±5.58	FA-FA	30.06±6.32
	AA-AA	24.08±4.79		
Trophectoderm (TE)	FA-AA	102.60±10.82	FA-FA	90.64±10.11
	AA-AA	95.43±12.28		
ICM/TE ratio	FA-AA	0.24±0.06	FA-FA	0.33±0.07
	AA-AA	0.26±0.06		

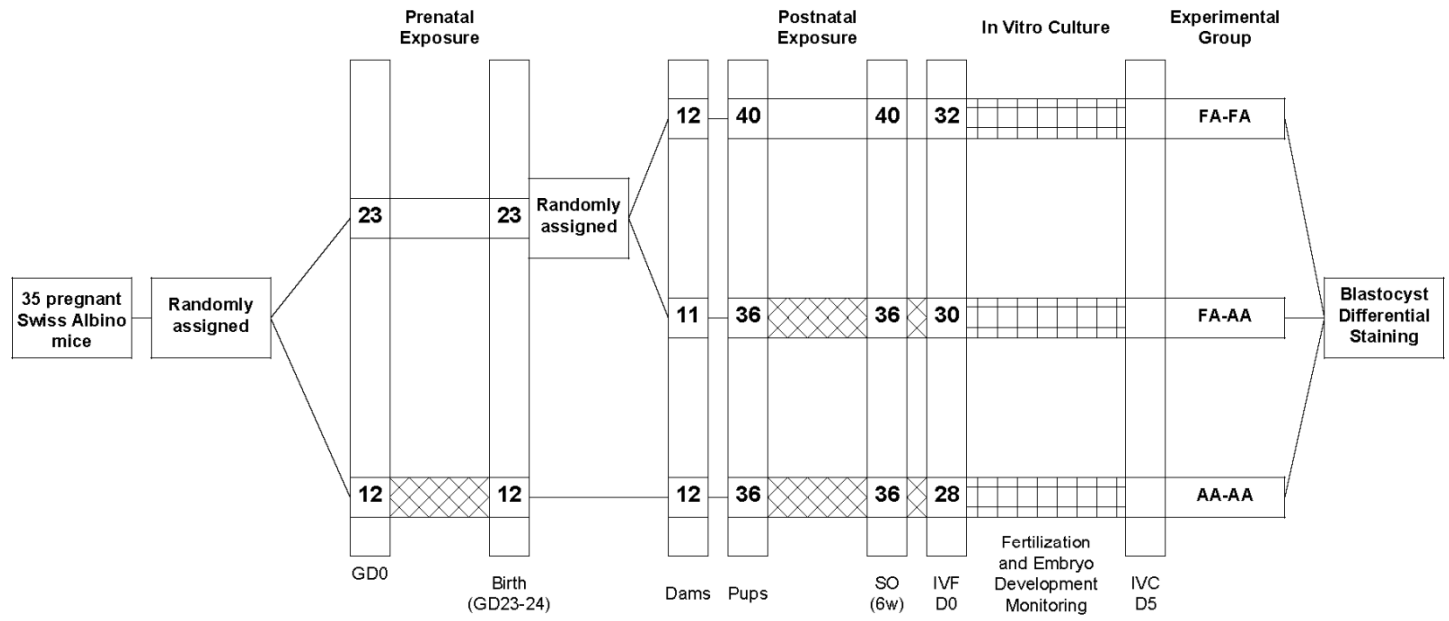
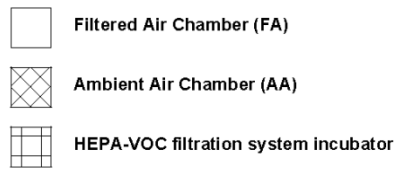
p<0.05, subset 1 vs. subset 2 (*post hoc* Tukey's HSD test, after MANOVA)

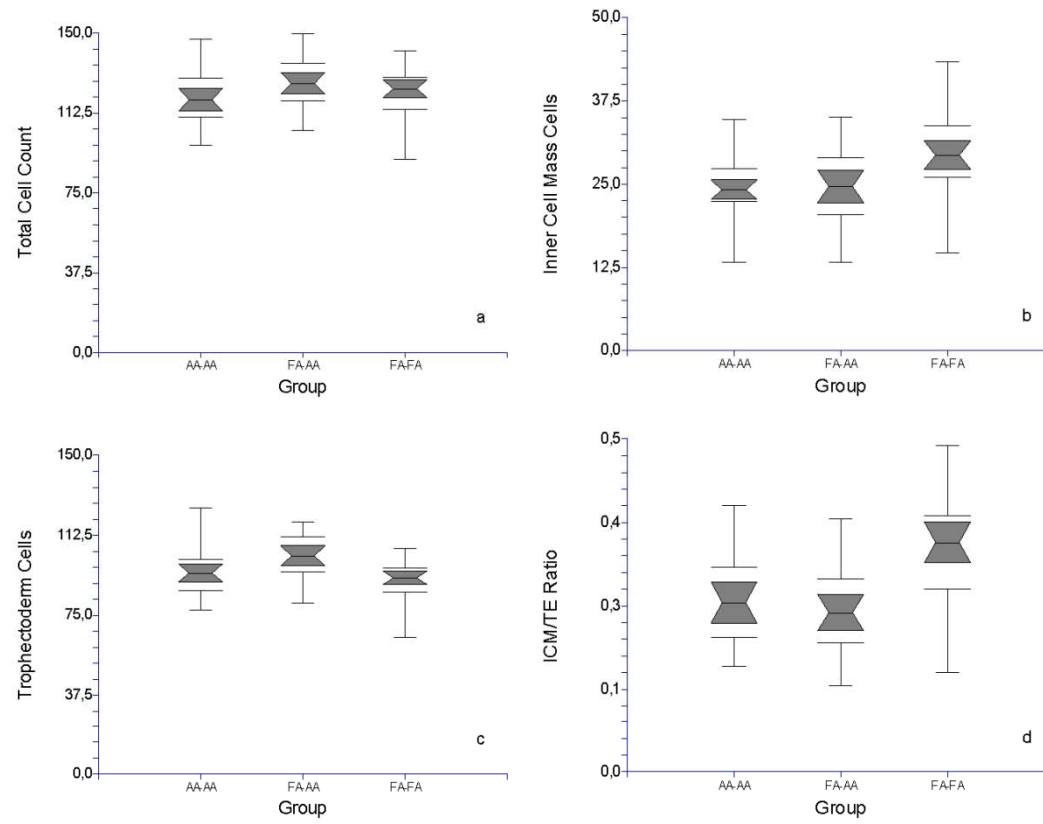
Legends:

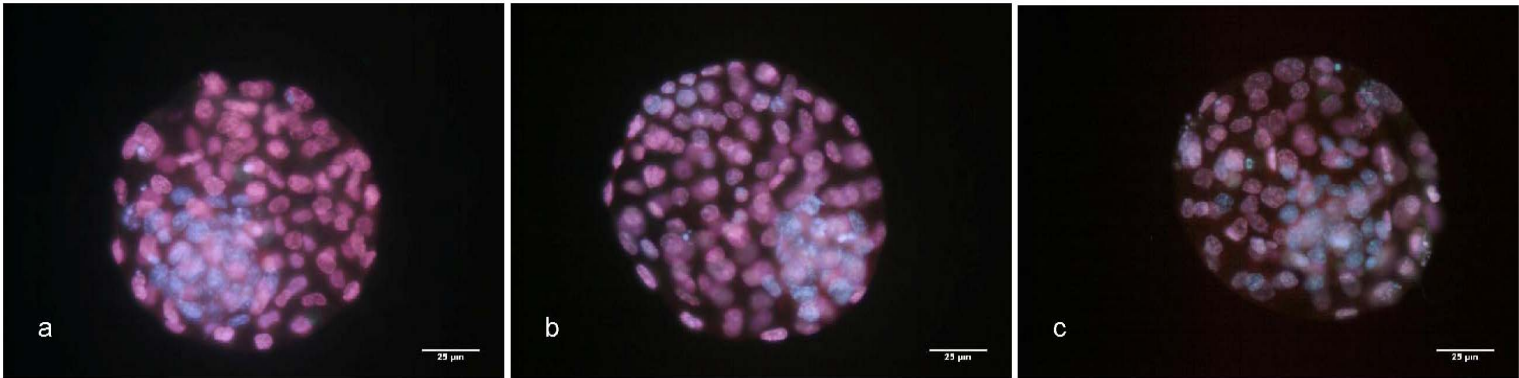
Figure 1. Experimental design (boxed values represent the number of female mice). GD = gestation day; SO = superovulation; IVF = *in vitro* fertilization; D = day; IVC = *in vitro* culture.

Figure 2. Notched box plots depicting the distribution of the total number of cells (a), the number of inner cell mass (ICM) cells (b), the number of trophectoderm (TE) cells (c), and the ratio of ICM to TE cells (d) in blastocysts produced by *in vitro* fertilization from Swiss albino female mice exposed pre- and postnatally to filtered (FA) and/or ambient (AA) air. The top and bottom of the box are the 25th and 75th percentiles and the line drawn through its middle represents the median (the 50th percentile). The length of the box is thus the interquartile range (IQR). The upper adjacent value is the largest observation that is less than or equal to the 75th percentile plus 1.5 times IQR. The lower adjacent value is the smallest observation that is greater than or equal to the 25th percentile minus 1.5 times IQR.

Figure 3. Differential staining of blastocysts obtained from Swiss albino female mice exposed pre- and postnatally to filtered (FA) and/or ambient (AA) air: (a) FA-FA group, (b) FA-AA group, and (c) AA-AA group. Blue and pink colors indicate inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) cells, respectively.







7.3. Anexo C

Running Title: Particulate air pollution and *in vitro* embryo development

***In vitro* fertilization, embryo development, and cell lineage segregation in preimplantation blastocysts after pre- and/or postnatal exposure of five-month-old Swiss Albino female mice to particulate air pollution**

Mariangela Maluf, M.D. ^{a,c}

Paulo Marcelo Perin, M.D. ^{a,c}

Daniela Aparecida Nicolosi Foltran Januário, B.Sc. ^{b,c}

Paulo Hilário Nascimento Saldiva, M.D., Ph.D. ^a

^a Department of Pathology, and ^b Department of Experimental Physiopathology, University of São Paulo School of Medicine, São Paulo; ^c Division of Reproductive Medicine, CEERH – Specialized Center for Human Reproduction, São Paulo, Brazil.

Conflict of interest: none

Financial support: none

Reprint requests: Mariangela Maluf, M.D., Division of Reproductive Medicine, CEERH – Specialized Center for Human Reproduction, R. Pará, n. 50, 12th floor, São Paulo 01243-0020, Brazil (FAX: 55-11-3258-0008; E-mail: mariangela@ceerh.com.br).

Capsule: Pre- and/or postnatal exposure of female mice to fine particulate matter does not affect fertilization or embryo development *in vitro* but impairs cell lineage segregation in the preimplantation blastocyst.

Abstract

Objective: To evaluate the effects of pre- and/or postnatal exposure to particulate air pollution on fertilization, embryo development, and cell lineage segregation in preimplantation blastocysts during late-life reproductive period, using the IVF mouse model.

Design: Animal model.

Setting: Academic institution.

Animals: Five-month-old, superovulated mice.

Intervention(s): Pre- and postnatally exposure to filtered air (FA-FA), filtered-ambient air (FA-AA), or ambient air (AA-AA) in exposure chambers, 24h/day, 7 days/wk, during 6 months.

Main Outcome Measure(s): Gestation length, litter size, sex ratio, ovarian response to superovulation, fertilization rate, embryo development, blastocyst and hatching rates, total cell number count, and proportion of cell allocation to inner cell mass (ICM) and trophoctoderm (TE).

Result(s): Gestation length, litter size, litter birth weight, live birth index, and sex ratio were similar among exposure groups. Ovarian response was not affected by the exposure protocol. A multivariate effect for pre- and/or postnatal exposure to ambient air on blastocyst differential staining but not on IVF and embryo development was found. Cell counts in ICM and ICM/TE ratios in blastocysts produced in FA-FA protocol were significantly higher than in blastocysts produced in FA-AA and AA-AA protocols. Cell counts in TE cells in blastocysts produced in FA-FA protocol were significantly lower

than in blastocysts produced in FA-AA and AA-AA protocols. The total cell count was similar among groups.

Conclusion(s): Our study suggests that the exposure to particulate air pollution of a large urban center may negatively affect the female reproductive health in the late-life period by disrupting the lineage specification at the blastocyst stage.

Key words: fine particulate matter, air pollution, *in vitro* fertilization, embryo development, blastocyst, inner cell mass, trophectoderm, lineage specification, late-life reproductive period, mouse

Introduction

Exposure to environmental contaminants present in the ambient air of many urban areas such as carbon monoxide (CO₂), sulfur dioxide (SO₂), nitrogen dioxide (NO₂), benzene, formaldehyde, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), and suspended particulate matter (PM) can not be easily avoided. These contaminants are known to cause harmful effects on human health including cardiovascular diseases, immunosuppression, cancer, or loss of fertility (1-4). However, the influence of air contamination specifically on female reproduction is not yet well established and very few studies on this area have been conducted (3, 5, 6). The difficulty to substantiate a clear correlation between air pollution and fertility impairment could be related to the multitude of factors involved not only on the reproductive competence, including age, hormonal and nutritional status, patency of the reproductive tract, gamete reserve and production, heredity, genetic polymorphism, and behavior, but also on the methodological challenges found in the laboratory to measure and determine this correlation.

The potential effects of chronic exposure to daily variations in air pollution on female fertility during the reproductive lifespan may go unacknowledged for years due to the possible cumulative or synergistic nature of these effects. This may represent a major cause of concern to the female reproductive health mainly when the ovarian tissue, composed of non-renewing cells like oocytes, is the target and the early onset of menopause the only clinical

expression of these effects. Although the mechanisms involved in the detrimental reproductive effect of smoking were not the same as those from exposure to air pollution, they may share similar pathways. A large body of research exists suggesting that female smokers undergo premature ovarian failure about three to five years earlier than the general population (7-9). This negative effect is more evident in older women approaching the end of their reproductive life, suggesting an accelerated decrease in the size of the oocyte pool in this specific population (10). Furthermore, toxic chemicals found in cigarette smoke may disrupt normal ovarian function impairing the production of steroid hormones, the process of oocyte-cumulus complex expansion, and oocyte nuclear maturation (11, 12). The outcome of in vitro fertilization (IVF) was compared between smokers and nonsmokers in various studies revealing either clinical (poorer ovarian response, increased gonadotrophin consumption, lower peak estradiol levels, higher cancellation rate, increased spontaneous miscarriage rate) or laboratory (fewer oocytes retrieved, reduced oocyte maturation, higher risk of fertilization failure, lower implantation rate) poorer results in the former group (13-18). However, recent studies were unable to show any effect of exposure to cigarette smoking either on in vitro embryo development or on IVF outcome (16, 19).

Previous experiments conducted in our laboratory have provided evidence that chronic exposure to ambient air of a large urban center has a significant impact on female reproductive function affecting pre- and post-implantation embryonic development. Exposure to fine PM (diameter $\leq 2.5 \mu\text{m}$, $\text{PM}_{2.5}$)

present in ambient air was implicated in disruption of the first two cell lineages allocation pattern at the blastocyst stage without interfering in the fertilization or early development of mouse embryos (personal communication). Defective post-implantation embryonic development resulted in an increase in the number of implantation failures, decreased number of viable fetuses, higher rates of miscarriage, and intrauterine mortality (3, 20).

Therefore, this study was designed to evaluate the effect of pre- and/or postnatal exposure of female mice to particulate air pollution at the end of their reproductive lifespan on breeding, ovarian response to superovulation, fertilization, embryo development, and cell lineage segregation in preimplantation blastocysts using the IVF mouse model, based on the hypothesis that chronic exposure to air pollution would worsen the detrimental effect that naturally occurs with the aging process on the ovarian reserve and on the gamete and/or embryo quality.

Materials and Methods

Animals

Random-bred Swiss Albino mice (School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil) were used for the study. Mice were housed in polycarbonate cages with wood shavings on the floor in a room under

controlled environmental conditions of 12-hour light/dark cycles, relative humidity of $50\pm 10\%$ and temperature of $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ for the breeding protocol, and under ambient conditions (temperature, humidity and photoperiod), 24 hours per day, 7 days per week, during the entire experiment for pre- and postnatal exposure to filtered air (FA) and/or ambient air (AA) protocols. Cage cleaning and bedding changes were done inside the experimental environment every other day. Animals received a supply of balanced commercial food (Nuvital-Nutrients Ltda.; Colombo, Paraná, Brazil) and fresh water *ad libitum*. Protocols used in the present study were approved by the ethics committee of the School of Medicine, University of São Paulo, and followed the “Principles of Laboratory Animal Care” published by the U.S. National Institutes of Health.

Exposure Setting and Inhalation Chambers

A detailed description of the exposure system used in this study was published in previous studies from our laboratory (3, 4). The exposure chambers were set up in the gardens of the School of Medicine, University of São Paulo in downtown São Paulo (Brazil), near heavily trafficked streets. The system’s concept is based on the principle of creating PM level gradient by filtering ambient air sampled from the surroundings. The exposure chambers, assembled side-by-side, are cylindrical aluminum structures measuring 2.0m in diameter and 2.15m high, covered by plastic ultraviolet (UV) film. The air intake and distribution occur in the base of the cylinder for

uniform dispersion throughout the chamber. Ambient air is forced into the chamber by large fans and exits at the top through a wide opening. Both chambers received ambient air at 20 m³/min. making this essentially a normobaric system: pressure inside did not exceed that of the outside by more than 3 cm H₂O. In the FA chamber three stages of filters in hermetically sealed boxes are lined up immediately after the fans. The first stage filter (Model TB; Purafil, São Paulo, São Paulo, Brazil) eliminates large particles and the second (Model JFL-90; Purafil) and third (HEPA filter; Purafil) trap fine particles. Gaseous pollutants were not retained by the filtering system, thus concentrations of nitrogen dioxide (NO₂), sulfur dioxide (SO₂) and carbon monoxide (CO) were assumed to be similar in both chambers.

Air Pollution Monitoring

Inside the exposure chambers the 24-hour concentration of PM_{2.5} was determined gravimetrically (21) by collecting particles from polycarbonate filters using Harvard impactors (Air Diagnostics, Harrison, ME, USA) at a flow rate of 10 LPM every other day and results were expressed as µg/m³. The mean (±SD) concentrations of PM_{2.5} for FA and AA exposure chambers were 11.32±7.93 µg/m³ and 29.71±13.55 µg/m³ during the prenatal period and 7.58±4.92 µg/m³ and 20.16±9.87 µg/m³ during the postnatal period. Prenatal PM_{2.5} mean concentrations were significantly higher than postnatal concentrations for each exposure chamber.

Experimental Design

Figure 1 depicts the study's experimental design. Natural cycling 6 to 8 weeks old, virgin females (n=30) were placed with proven 10-week old breeder males (n=10) to mate naturally in the proportion of three females to one male. Mating was confirmed the following morning by the presence of a vaginal plug (gestation day 0 = day of postcoital plug) and the females were separated from the males. For prenatal exposure the pregnant mice (n=18) were randomly placed into either FA (n=11) or AA (n=7) chambers, housed four per cage. As soon as females displayed visual evidence of pregnancy they were checked daily until parturition. Within the first 24 hours after parturition, gestation length, litter size, litter birth weight, live birth index (number of live offspring / number of offspring delivered), and sex of the offspring (determined by anogenital distance) were recorded. At this time, 5 females and offspring from the FA chamber were randomly selected and transferred to the AA exposure chamber (postnatal exposure). The remaining 13 females and offspring were kept in their original location. After weaning the animals were separated and only female born under the experiment conditions continued in the chambers, housed four per cage. The study comprises three different experimental groups: 1) Pre- and postnatal exposure to filtered air (FA-FA group, n=24); 2) Prenatal exposure to filtered air and postnatal exposure to ambient air (FA-AA group, n=31); 3) Pre- and postnatal exposure to ambient air (AA-AA group, n=27). After five months of postnatal exposure all females were superovulated as described below and killed by cervical dislocation immediately before oocyte collection.

Preparation of Culture Media

Different culture media were used for each IVF step: 1) Collection medium – used for the collection of oocytes from oviducts and for the isolation of the cauda epididymis and vas deferens, modified human tubal fluid (mHTF no. 90126; Irvine Scientific, Santa Ana, CA) prewarmed to 37°C. The mean pH value of this medium was 7.34 ± 0.04 in ambient air; 2) Insemination medium – used for sperm capacitation and IVF, human tubal fluid (HTF no. 90125; Irvine Scientific) containing 10% serum substitute supplement (SSS no. 99193; Irvine Scientific). The mean pH value of this medium was 7.29 ± 0.05 in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C; 3) Embryo culture medium – used for embryo culture up to the blastocyst stage, potassium-enriched simplex optimized medium (KSOM) with glucose and amino acids (KSOM with amino acids no. MR-107; Specialty Media, Chemicon, Phillipsburg, NJ) supplemented with 5 mg / mL of human serum albumin (HSA-solution no. 10064; Vitrolife AB, Gothenburg, Sweden). The mean pH value of KSOM^{AA} medium was 7.28 ± 0.03 in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C. Insemination and embryo culture media were overlaid with embryo-tested mineral oil (Oil for Embryo Culture no. 9305; Irvine Scientific) and equilibrated overnight in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C. The same batch of each culture medium was used in all experiments.

Gonadotrophin Stimulation and Oocyte Collection

Females from each postnatal exposure group were superovulated at 5 months of age by intraperitoneal injection of 10 IU of equine chorionic gonadotrophin (eCG, Folligon 1,000 IU; Intervet International, São Paulo, São Paulo, Brazil) followed 48 hours later by an intraperitoneal injection of 10 IU of human chorionic gonadotrophin (hCG, Choragon 5,000 IU; Ferring, São Paulo, São Paulo, Brazil). The oviducts were removed between 14 and 16 hours after hCG administration and were placed in prewarmed collection medium. Cumulus-oocyte complexes were released from the ampullar oviduct at the site of the cumulus bulge by tearing it with a 30-gauge needle. All intact cumulus masses of each female were washed through two drops of insemination medium to remove debris and blood, after which they were transferred to a 100- μ L drop of the same medium overlayersed with embryo-tested mineral oil in 35-mm culture dishes (Falcon no. 3001; Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ) before fertilization in vitro.

Sperm Retrieval and Capacitation

Ten proven 10-week-old breeder males of the same strain were killed 12-13 hours after the females were injected with hCG. After exposure of the peritoneal cavity, the cauda epididymis and vas deferens were removed from each testis, washed immediately in prewarmed collection medium, and transferred to a 400- μ L drop of insemination medium in a 35-mm culture dish

equilibrated overnight under embryo-tested mineral oil in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C. Spermatozoa were gently squeezed out of the epididymis using a watchmaker's forceps, and the residual caudal tissue was discarded. The spermatozoa retrieved from the mice were mixed together, and capacitation was allowed to proceed for 60 to 90 min at 37°C in 5% CO₂. Sperm concentration was assessed using a Makler chamber.

In Vitro Fertilization and Embryo Culture

The IVF and embryo culture procedures were performed in HEPA-VOC filtration system incubators (Series II Water Jacketed Incubator, Model 3110; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The IVF procedure was carried out in 100- μ L drops of insemination medium under mineral oil. The capacitated sperm suspension, pre-incubated as described above, was gently added to the drops containing cumulus-oocyte complexes to yield a final motile sperm concentration of 3 to 4 x 10⁶/mL. After incubation with sperm suspension at 37°C under 5% CO₂ in air for 4 hours, the cumulus cells and attached sperm were mechanically removed from the oocytes by aspirating them several times through a fine-drawn glass pipette. Following rinsing, fertilized oocytes from each female were allotted to groups of 10 and cultured in 20- μ L drops of KSOM medium for 120 hours. Embryo culture dishes were prepared the day before cumulus-oocyte complex collection with drops of the culture medium overlaid with embryo-tested mineral oil in 35-mm dishes and equilibrated

overnight on open incubator shelves in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C.

Embryo Evaluation

Embryo examination was done on the heated stage (~37°C) of an inverted microscope at X200 magnification (Eclipse TE2000-U with Hoffman modulation contrast; Nikon, Melville, NY) 6, 96 and 120 hours after insemination (days 1, 4 and 5, respectively). Fertilization assessment was carried out six to eight hours after insemination. Oocytes presenting two pronuclei (2PN) and two polar bodies were considered normally fertilized. On days 4 and 5 embryo morphology, developmental progress, number of embryos reaching blastocyst stage (the blastocoele occupying at least 80% of total embryo volume) and the numbers of blastocysts that at least started hatching were recorded. Blastocyst morphology classification was based on criteria described by Gardner and Lane (22). The hatching status of blastocysts identified on days 4 and 5 was graded on a 4-point scale from 0 to 3, where 0 = zona enclosed, 1 = initially (herniation of zona pellucida by less than 50% of the embryo), 2 = partially (herniation of zona pellucida by at least 50% of the embryo), and 3 = completely hatched blastocysts. A weighted hatching score representing the sum of the hatching status grade of every blastocyst divided by the total number of blastocysts was calculated for the evaluations occurring at 96 and 120 hours after insemination (*Score*₉₆ and *Score*₁₂₀, respectively) for each female. The present system awards a

total possible score of 3 for each evaluation day. A discriminatory scoring system (*D Score*) was then developed to identify the developmental potential between evaluations of the cohort of blastocysts from each female. The *D Score* was weighted by the equation:

$$D \text{ Score} = ((\text{Score}_{120}/3) + (\text{Score}_{96}/3)) - ((\text{Score}_{120} - \text{Score}_{96})/6)$$

The rationale behind this system was to balance the hatching status and the developmental potential of blastocysts in order to facilitate the separation of females with cohorts of blastocysts presenting similar hatching status but different developmental potential. This scoring system produces a maximum score of $((3/3) + (3/3)) - ((3-3)/6) = 2$.

Differential Inner Cell Mass and Trophectoderm Cell Counts

By day 5 of culture (120 hours after insemination), differential cell counts of the inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) of three blastocysts produced *in vitro*, randomly selected from each female mice, were determined by a modification in a method described by Thouas *et al.* (2001) (23). Briefly, intact blastocysts (in groups of three to five) were incubated for 10 seconds in 500 μL of HTF medium containing 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of propidium iodide (PI; Chemicon, Temecula, CA) and 1% Triton X-100 (TX-100; Sigma, St. Louis, MO). The blastocysts were then transferred to fixative solution containing 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of bisbenzimidazole (H33258; Hoechst AG, Frankfurt,

Germany) and 100% ethanol (no. 1.00983.1000; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), and stored overnight at 4°C. Fixed and stained blastocysts were then transferred into glycerol, individually placed on glass microscope slides under coverslips and visualized for cell counting. Counting was performed from digital photographs of images obtained on an epifluorescence microscope (Eclipse 90i; Nikon, Melville, NY) fitted with a mercury lamp and excitation filters (460 nm for blue and red fluorescence, and 560 nm for red only). An observer blind to experimental protocols performed all cell counts.

Statistical Analysis

The experimental unit was an individual female mouse for the assessment of either the reproductive success and the morphological development of zygotes produced by in vitro fertilization, according to the pre- and postnatal exposure to FA and/or AA. Gestation length, litter size, litter birth weight, litter birth index, and sex ratio (Male / Female + Male) variables were analyzed using two-sample Hotelling's T² test assuming homogeneity of variance by Bartlett-Box test. The genetic variability of the mice used in this study determined different patterns of ovarian response to superovulation which were identified and grouped through the K-means cluster analysis method performed on the number of oocytes retrieved and inseminated as poor (centroids: 20.3±7.0 and 17.7±5.5, respectively), moderate (centroids: 42.3±6.5 and 38.4±6.5, respectively), or high (centroids: 68.5±9.3 and 62.6±7.8, respectively) responders. Thus, ovarian response was analyzed as

a categorical independent variable in order to evaluate its effect on each experimental group. Categorical data regarding ovarian response to superovulation in each experimental group were evaluated using a chi-square test. For the assessment of the morphological development of zygotes *in vitro*, the experimental unit was the mean number of zygotes per female mouse. However, only the drops of culture medium containing all the 10 zygotes were included in the analysis. The dependent variables for this assessment included: number of zygotes, fertilization rate, number of blastocysts and of blastocysts that at least started hatching at 96 and 120 hours after insemination, blastocyst formation and hatching rates at 96 and 120 hours after insemination, *D Score*, total cell number and the numbers of ICM and TE cells from blastocysts that had developed 120 hours after insemination. All percentage data were subjected to arcsine transformation. The effects of pre and/or postnatal ambient air exposure and ovarian response on each dependent variable were evaluated performing a multivariate analysis of variance (MANOVA). The Tukey HSD *post hoc* test was used for all comparisons of individual dependent variables between groups. Distribution of the cell populations was displayed using notched boxplots. A computer-generated list of random numbers was used whenever randomization was necessary. Data are presented as mean \pm standard deviation (SD). The data were analyzed using Statistics Package for Social Sciences version 13.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, USA).

Results

Animal Exposure to Filtered or Ambient Air and Breeding

Table 1 shows the reproductive performance of pregnant mice exposed to either AA or FA. Gestation length, litter size, litter birth weight, live birth index, and sex ratio did not differ significantly between exposure groups.

Ovarian Response to Superovulation After Pre- and/or Postnatal Exposure to Ambient Air

Ovarian response to superovulation was absent in 14.3%, 17.9% and 15.4% of the mice in groups FA-FA, FA-AA, and AA-AA, respectively. The number of females presenting low, moderate or high response to superovulation was 5, 5, and 8 in FA-FA group, 8, 9, and 6 in FA-AA group, and 4, 8, and 10 in AA-AA group, showing that the distribution of the different patterns of ovarian response to superovulation was not affected by the pre- and/or postnatal exposure of the female mice to ambient air (chi-square = 3.029; $P=.805$).

In Vitro Fertilization, Embryo Development, and Differential Nuclear Staining

Means (\pm SD) for all *in vitro* embryonic development variables according to ovarian response pattern for each exposure group are reported in Table 2.

Effects of the Ovarian Response

A multivariate effect for ovarian response on *in vitro* fertilization and embryo development and on blastocyst cell segregation was found (Pillai's trace = 0.62; $F = 1.66$; $P = .05$; power = 0.952). The univariate analysis of the effect of the ovarian response on each parameter of *in vitro* fertilization and embryo development to blastocyst stage is shown in Table 3. No significant differences in *in vitro* fertilization and embryo development or in blastocyst cell segregation were found for any ovarian response pattern in the univariate analysis. Post hoc comparison of embryonic developmental parameters or blastocyst cell segregation by ovarian response pattern showed no difference between the patterns.

Effects of the Exposure to Ambient Air

A multivariate effect for pre- and/or postnatal exposure to ambient air on *in vitro* fertilization and embryo development and on blastocyst cell segregation was found (Pillai's trace = 1.04; $F = 3.98$; $P = .000$; power = 1.000). The univariate analysis of the effect of the exposure protocol on each parameter of *in vitro* fertilization and embryo development to blastocyst stage is shown in Table 3. No significant differences were found for any exposure protocol in the univariate analysis. Figure 2 shows distribution of the total number of cells, cells in the ICM and TE, and the ratio of ICM to TE cells of blastocysts originated from oocytes fertilized *in vitro*, obtained from females exposed pre-

and/or postnatally to filtered and/or ambient air. The univariate analysis of the effect of the exposure protocol on each parameter of blastocyst cell segregation is shown in Table 3. Allocation of ICM and TE cells for each exposure protocol is shown in Figure 3. The exposure protocol revealed a significant effect on ICM cell count, TE cell count, and on the ICM/TE ratio but no significant difference among the exposure protocols in total cell count. *Post hoc* comparison of the blastocyst cell segregation parameters by the exposure protocol showed significant differences between groups. The cell counts in the ICM and the ICM/TE ratios in blastocysts produced in the FA-FA protocol were significantly higher ($p < 0.05$) than in blastocysts produced in the FA-AA and AA-AA protocols. However, cell counts in the TE in blastocysts produced in FA-FA protocol were significantly lower ($p < 0.05$) than in blastocysts produced in the FA-AA and AA-AA protocols (Table 4).

Table 2 shows that no significant ovarian response \times exposure protocol interaction on *in vitro* fertilization and embryo development or on blastocyst cell segregation was observed (Pillai's trace = 0.93; $F = 1.16$; $P = .248$; power = 0.973).

Discussion

Our data show that chronic preconceptional exposure of female mice to ambient PM_{2.5} mainly derived from vehicular emissions throughout the reproductive lifespan reduces the allocation of cells to the embryonic lineage

without changing the total cell count in blastocysts, compromising implantation potential and viability of the embryo and suggesting a deviation of cell segregation to the placental lineage. Furthermore, embryos from mice exposed pre- and/or postnatally to ambient PM_{2.5} present a similar pattern of lineage specification disruption reflecting that this effect was not enhanced by prenatal exposure and could be specifically linked to postnatal exposure. On the other hand, reproductive outcome at birth, ovarian response to superovulation, or fertilization and preimplantation embryo development potential in vitro were not affected in female mice chronically exposed to ambient PM_{2.5} reaching the end of their reproductive lives. The large interindividual variability in the ovarian response to gonadotrophins due to the genetic background of the mouse strain selected did not affect cell lineage segregation in blastocysts or alter susceptibility of mice to the effects of ambient PM_{2.5} exposure on lineage specification at the blastocyst stage.

In recent years, air pollution was included as an important risk factor for reproductive health and linked to infertility incidence increase among younger women (24). In fact, various studies have shown that exposure to environmental particulate air pollution could be implicated in decreased fertility both in males and females (3, 25) and adverse obstetric outcomes including intrauterine growth retardation, intrauterine mortality, preterm birth, low birth weight, and birth defects (26-30). However, most of them focused on the detrimental effects of prenatal rather than preconceptional exposure. Few experimental studies evaluated the effects of chronic exposure to air

pollution on female reproductive potential and to our knowledge none of them specifically addressed these effects on female gametes or preimplantation embryo development (3, 20). The analysis of the reproductive endpoints in these studies showed a significant decrease in the number of viable fetuses, an increase in the number of implantation failures and miscarriages.

Nevertheless, despite the correlation observed between the exposure to ambient air pollution and early pregnancy loss, the biological mechanism through which it might influence pregnancy viability is still unclear. In a recent study, we were able to demonstrate that the exposure of young mice to $PM_{2.5}$ present in ambient air was implicated in disruption of the first two cell lineages allocation pattern at the blastocyst stage without interfering in the fertilization or early development of the embryos (personal communication).

Based on these observations and on the contemporary tendency in our society of women to delay childbearing until relatively late in their reproductive lives, our study was designed to test the hypothesis that chronic exposure to particulate air pollution may in fact have a more profound impact on cell lineage segregation in blastocysts in the latter part of reproductive life, using the IVF mouse model.

In the current experiment we found no difference in the reproductive outcome of mice exposed to ambient or filtered air in terms of gestation length, litter size, litter birth weight, live birth index, and sex ratio. The same results were found in a previous study from our laboratory in which pregnant mice were exposed to ambient $PM_{2.5}$ during the same time frame (personal

communication). These findings partially disagree with a previous study in which a poorer reproductive outcome, reflected by the loss of 33% of live-born pups per mouse in the group exposed to environmental air pollution was observed (3). The discrepancy observed among these studies could be attributed to methodological differences of the latter study, mainly the mouse strain used, different exposure period, and differential exposure to NO₂.

The detrimental effect of smoking on ovarian reserve increasing the rate of follicular depletion and accelerating the loss of reproductive function (31), more evident in older women (13), prompted us to investigate the effects of pre- and/or postnatal exposure of female mice at the end of their reproductive life to ambient PM_{2.5} on the ovarian response to gonadotrophins. Even though the mechanisms involved in the detrimental reproductive effect of smoking were not the same as those from the air pollution exposure, they may share similar pathways since PM_{2.5} contains high concentrations of toxic substances such as organic compounds (polycyclic aromatic hydrocarbons) and soluble metals, the primary toxicants found in cigarette smoke. Our results showed that the distribution pattern of the different levels of ovarian response to gonadotrophins among female mice pre- and/or postnatally exposed to ambient PM_{2.5} undergoing IVF was similar to that from the control group, suggesting that chronic exposure to daily variations in ambient PM_{2.5} may not affect ovarian reserve or if it affects it may have no clinical importance throughout the reproductive lifespan. This finding confirm previous observation in young mice that exposure to particulate air pollution

does not affect ovarian response to gonadotrophins (personal communication).

No effect on in vitro fertilization, embryo development up to the blastocyst stage, or hatching process was observed in mice exposed to ambient air when compared to those exposed to filtered air, independently of prenatal exposure or ovarian response pattern. The same results were found in previous studies from our laboratory in which mice at the beginning of their reproductive lives were either exposed to diesel exhaust particles during a short period of time or chronically exposed to ambient PM_{2.5} (personal communication), although in the latter study the ovarian response pattern had a negative impact on preimplantation embryo development as evidenced by the significant impairment of in vitro fertilization and embryo development observed in the high response group when compared to moderate and poor response subgroups. The lack of effect of ovarian response pattern on the embryo development observed in this study may be attributed to the natural decline in ovarian function since the mice selected for this study were at the end of their reproductive lives.

The functional differentiation of embryonic cells into two distinct lineages, the ICM cells that bring about all embryonic tissues and part of the extraembryonic membranes and the TE cells that contribute mainly to the formation of fetal placenta results in the formation of the blastocyst and the size of each cell population as well as their ratio influence its growth, viability,

and implantation potential as evidenced in experimental and clinical studies (32-34). Although the molecular regulation of cell segregation at the blastocyst stage is attributed to the function of transcription factors Oct4 and Nanog (ICM cell lineage) and Cdx2 (TE cell lineage), this process is still not fully understood (34, 35). The proper specification of ICM and TE lineages required for normal blastocyst development results from the control that Oct4 and Cdx2 exert on each other's expression (36). Due to differences in cell positioning and metabolic requirements the ICM cells are more sensitive to embryotoxic agents (37). Thus, the disturbance in pathways involved in the gene expression of those transcription factors due to environmental conditions and cell lineage specific sensitivity may negatively affect embryo development and influence the pattern of latter development.

Our results show that pre- and/or postnatal exposure to ambient PM_{2.5} disrupts the normal regulation of cell specification at the blastocyst stage by significantly reducing the proliferation of ICM cell population and decreasing the ICM/TE ratio and, consequently, limits the stem cell pool for fetal and extraembryonic lineages. On the other hand, the total cell number of blastocysts obtained from mice exposed to ambient PM_{2.5} was not affected as a result of an increase in the number of TE cells suggesting a deviation of the normal segregation process towards TE cell lineage. The magnitude of this effect was not changed neither by the age of the mice, prenatal exposure to ambient PM_{2.5} or by ovarian response pattern to gonadotrophins, and was in fact the same as the one we observed in a similar experiment using mice

at the beginning of their reproductive lives (personal communication). The cell lineage specification disruption at the blastocyst stage identified in this study may indicate the pathway through which poor obstetric outcome, reflected by implantation failure and early pregnancy loss, was previously observed in mice exposed to air pollution (3). Based on these findings we could hypothesize that ambient $PM_{2.5}$ could either determine the overexpression of the transcription factor *Cdx2* directing the allocation of the initially totipotent cells of the embryo to the TE lineage or trigger the oxidative DNA damage and cell apoptosis reducing significantly ICM cell population, and thus negatively influence pregnancy viability in mice exposed to ambient $PM_{2.5}$.

Some important strengths of the study's experimental design include the use of an exposure chamber that closely mimics the level of particulate air pollution that is common in many large urban environments, the confirmation of the disruption of cell lineage specification at the blastocyst stage of embryo development at either extreme of reproductive lifespan of mice exposed to ambient $PM_{2.5}$ that shared at least in part the same conditions of exposure during pregnancy and the first six weeks of postnatal life, and the observation that long-term, repeated exposure to particulate air pollution does not enhance the disruptive effect on the segregation of the first two cell lineages of the embryo in older mice despite their genetic variability. On the other hand, some limitations of our study should be pointed out. First, we cannot specifically attribute the reproductive toxicity to ambient $PM_{2.5}$ since the

filtering system of the chambers did not retain gaseous pollutants and the range of the detrimental effects of physical and chemical interaction among them was not evaluated. Epidemiologic studies evaluating the role of gaseous pollutants as confounders of ambient PM_{2.5} health effects showed that the use of multiple pollutant models in these studies may not be suitable and the health effects attributed to ambient gases may actually be a result of exposure to ambient PM_{2.5}, a reasonable surrogate of personal PM_{2.5} exposure (38-40). Second, the experiment performed in vitro does not allow us to infer the findings to the general population since the effects of the exposure to ambient PM_{2.5} on the cell lineage specification of blastocysts derived from zygotes produced in vivo were not evaluated in this study. Third, although the observed effect can be linked to pregnancy viability loss, the only way to assess this speculation should be the transfer of the blastocysts produced in each exposure protocol to pseudopregnant mice. In order to clarify these limitations new experiments are needed.

In conclusion, this study provides further support for our previous observation that chronic exposure to ambient PM_{2.5} can disrupt the allocation pattern of the first two cell lineages at the blastocyst stage both in young and old female mice in a similar way, compromising implantation potential and future viability of the embryos. The specific reduction of ICM cell population may contribute to the elucidation of the mechanism whereby the exposure to particulate air pollution increases the rates of implantation failure and early pregnancy loss. Additional research is required to further investigate the biologic mechanisms

that associate the exposure to ambient PM_{2.5} and poor obstetric outcome, including pregnancy viability and normal development. Furthermore, due to the nature of the exposure to ambient PM_{2.5} in large urban areas, these findings have important consequences for female reproductive health.

Acknowledgments

The authors wish to thank Alessandro M. Mazzoni, B.Sc., Ph.D. for assistance in statistical analysis.

References

1. Grevenynghe J, Sparfel L, Vee M, Gilot D, Drenou B, Fauchet R *et al.* Cytochrome P450-dependent toxicity of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons towards human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;317:708-16.
2. Harrison R, Smith D, Kibble A. What is responsible for the carcinogenicity of PM_{2.5}? *Occup Environ Med* 2004;61:799-805.
3. Mohallem S, Lobo D, Pesquero C, Assunção J, Andre P, Saldiva P *et al.* Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. *Environ Res* 2005;98:196-202.
4. Lemos M, Mohallem S, Macchione M, Dolhnikoff M, Assunção J, Godleski J *et al.* Chronic Exposure to Urban Air Pollution Induces Structural Alterations in Murine Pulmonary and Coronary Arteries. *Inhalation Toxicology* 2006;18:247–53.
5. Carpenter D, Shen Y, Nguyen T, Le L, Lininger L. Incidence of endocrine disease among residents of New York areas of concern. *Environ Health Perspect* 2001;109(Suppl 6):845–51.
6. Tomei G, Ciarrocca M, Fortunato B, Capozzella A, Rosati M, Cerratti D *et al.* Exposure to traffic pollutants and effects on 17-beta-estradiol (E2) in female workers. *Int Arch Occup Environ Health* 2006;80:70-7
7. Prospero F, Luzi S, Iacopini Z. Cigarette smoking damages women's reproductive life. *Reprod Biomed Online* 2004;8:246-7.
8. Kinney A, Kline J, Levin B. Alcohol, caffeine and smoking in relation to age at menopause. *Maturitas* 2006;54 27-38.

9. Reynolds R, Obermeyer C. Age at natural menopause in Spain and the United States: results from the DAMES project. *Am J Hum Biol* 2005;17:331-40.
10. Kinney A, Kline J, Kelly A, Reuss M, Levin B. Smoking, alcohol and caffeine in relation to ovarian age during the reproductive years. *Hum Reprod* 2007;22:1175-85.
11. Valdez K, Petroff B. Potential roles of the aryl hydrocarbon receptor in female reproductive senescence. *Reprod Biol* 2004;4:243-58.
12. Mlynarcikova A, Fickova M, Scsukova S. Ovarian intrafollicular processes as a target for cigarette smoke components and selected environmental reproductive disruptors. *Endocrine Regulations* 2005;39:20-31.
13. Zenzes M, Reed T, Casper R. Effects of cigarette smoking and age on the maturation of human oocytes. *Hum Reprod* 1997;12:1736-41.
14. El-Nemr A, Al-Shawaf T, Sabatini L, Wilson C, Lower A, Grudzinskas J. Effect of smoking on ovarian reserve and ovarian stimulation in in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1998;13:2192-8.
15. Ness R, Grisso J, Hirschinger N, Markovic N, Shaw L, Day N *et al.* Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med* 1999;340:333-9.
16. Neal M, Hughes E, Holloway A, Foster W. Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes. *Hum Reprod* 2005;20:2531-5.
17. Motejlek K, Palluch F, Neulen J, Grümmer R. Smoking impairs angiogenesis during maturation of human oocytes. *Fertil Steril* 2006;86:186-91.
18. Gruber I, Just A, Birner M, Lösch A. Effect of a woman's smoking status on oocyte, zygote, and day 3 pre-embryo quality in in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril* 2007;doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.06.108.
19. Wright K, Trimarchi J, Allsworth J, Keefe D. The effect of female tobacco smoking on IVF outcomes. *Hum Reprod* 2006;21:2930-4.
20. Silva I, Lichtenfels A, Saldiva P. Increase abortion in mice exposed to environmental air pollution in Sao Paulo. *Fertil Steril* 2005;84(Suppl 1):S404-5.
21. Hinds W, ed. *Aerosol Technology: Properties, Behaviour, and Measurement of Airborne Particles*. Second ed. New York: Wiley-Interscience, 1999.
22. Gardner D, Lane M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod* 1993;48:377-85.
23. Thouas GA, Korfiatis NA, French AJ, Jones GM, Trounson AO. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod BioMed Online* 2001; 3:25-9.
24. Barrett J. Fertile grounds of inquiry: environmental effects on human reproduction. *Environ Health Perspect* 2006;114:A644-9.

25. Sokol R, Kraft P, Fowler I, Mamet R, Kim E, Berhane K. Exposure to environmental ozone alters semen quality. *Environ Health Perspect* 2006;114:360–5.
26. Liu S, Krewski D, Shi Y, Chen Y, Burnett R. Association between maternal exposure to ambient air pollutants during pregnancy and fetal growth restriction. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2007;17:426-32.
27. Pereira L, Loomis D, Conceição G, Braga A, Areas R, Kishi H *et al.* Association between air pollution and intrauterine mortality in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect* 1998;106:325-9.
28. Huynh M, Woodruff T, Parker J, Schoendorf K. Relationships between air pollution and preterm birth in California. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2006;20:454-61.
29. Dugandzic R, Dodds L, Stieb D, Smith-Doiron M. The association between low level exposures to ambient air pollution and term low birth weight: a retrospective cohort study. *Environ Health* 2006;5:3 (ISSN: 1476-069X) 2006;5:3.
30. Gilboa S, Mendola P, Olshan A, Langlois P, Savitz D, Loomis D *et al.* Relation between ambient air quality and selected birth defects, seven county study, Texas, 1997-2000. *Am J Epidemiol* 2005;162:238-52.
31. Jurisicova A, Taniuchi A, Li H, Shang Y, Antenos M, Detmar J *et al.* Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons diminishes murine ovarian reserve via induction of HaraKiri. *J Clin Invest* 2007;117:3971–8.
32. Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M, Sajko M. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reprod Biomed Online* 2004;8:687-94.
33. Fleming T, Kwong W, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A *et al.* The embryo and its future. *Biol Reprod* 2004;71:1046–54.
34. Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson R, Rossant J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn* 2006;235:2301-14.
35. Ralston A, Rossant J. Cdx2 acts downstream of cell polarization to cell-autonomously promote trophectoderm fate in the early mouse embryo. *Dev Biol* 2008;313:614-29.
36. Strumpf D, Mao C, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F *et al.* Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development* 2005;132:2093-102.
37. Pampfer S. Apoptosis in rodent peri-implantation embryos: differential susceptibility of inner cell mass and trophectoderm cell lineages - a review. *Placenta* 2000;21(Suppl A):S3-10.
38. Sarnat J, Koutrakis P, Suh H. Assessing the relationship between personal particulate and gaseous exposures of senior citizens living in Baltimore, MD. *J Air Waste Manag Assoc* 2000;50:1184-98.
39. Sarnat J, Schwartz J, Catalano P, Suh H. Gaseous pollutants in particulate matter epidemiology: confounders or surrogates? *Environ Health Perspect* 2001;109:1053-61.
40. Liu L, Box M, Kalman D, Kaufman J, Koenig J, Larson T *et al.* Exposure assessment of particulate matter for susceptible populations in Seattle. *Environ Health Perspect* 2003;111:909–18.

Table 1. Assessment of reproductive variables at the time of birth in five-month-old Swiss Albino pregnant mice according to prenatal exposure to filtered (FA) or ambient (AA) air.

Reproductive Variable	Exposure Protocol	
	FA	AA
Gestation length (days)	24.73±1.90	25.14±3.08
Litter size	9.18±2.89	9.00±2.77
Litter birth weight (g)	1.72±0.02	1.71±0.06
Live birth index	0.93±0.08	0.98±0.05
Sex ratio (M/M+F)	0.46±0.07	0.58±0.15

$T^2 = 12.178$, $p = 0.182$

Table 2. Effects of the pre- and postnatal exposure of five-month-old Swiss Albino female mice to filtered (FA) and/or ambient (AA) air on *in vitro* embryo development and lineage specification (inner cell mass, ICM; trophectoderm, TE) in the blastocyst according to ovarian response. For explanation of the discriminatory score (*D Score*), see text.

Dependent Variable	Exposure Protocol								
	FA-FA			FA-AA			AA-AA		
	Poor Responder	Moderate Responder	High Responder	Poor Responder	Moderate Responder	High Responder	Poor Responder	Moderate Responder	High Responder
Zygote	9.57.43	9.15±1.17	8.98±0.77	9.30±0.59	9.05±0.70	9.18±0.62	9.50±0.43	9.08±1.43	9.14±0.57
Fertilization rate	0.95±0.05	0.91±0.11	0.89±0.08	0.92±0.06	0.90±0.07	0.91±0.07	0.95±0.04	0.90±0.15	0.92±0.06
Blastocyst (96h)	8.02±1.53	7.47±1.71	7.56±1.17	7.22±1.95	6.69±1.60	6.65±1.09	5.84±2.95	7.44±1.69	6.76±2.42
Blastocyst rate (96h)	0.85±0.14	0.82±0.12	0.84±0.12	0.81±0.19	0.73±0.20	0.73±0.12	0.60±0.25	0.80±0.09	0.73±0.23
Hatching (96h)	4.68±2.39	3.47±2.37	4.77±1.50	3.22±1.94	3.73±1.69	3.19±1.26	2.09±2.49	4.44±2.46	3.28±1.80
Blastocyst (120h)	9.13±0.62	8.60±1.21	8.30±0.60	8.55±0.88	8.38±0.59	8.26±1.15	8.33±1.05	8.44±1.50	8.10±1.38
Blastocyst rate (120h)	0.96±0.04	0.94±0.05	0.92±0.03	0.94±0.07	0.92±0.06	0.90±0.07	0.87±0.10	0.92±0.07	0.88±0.12
Hatching (120h)	8.45±0.99	7.37±1.07	7.85±0.61	8.14±0.83	7.99±0.81	7.52±1.23	7.17±1.97	8.17±1.48	7.47±1.81
<i>D Score</i>	0.66±0.20	0.53±0.19	0.66±0.11	0.57±0.13	0.60±0.10	0.58±0.13	0.49±0.15	0.66±0.19	0.53±0.14
Total cell count	126.8±10.2	127.0±14.0	132.4±11.9	130.7±12.6	123.7±11.5	134.1±11.4	126.2±13.6	127.7±10.0	125.5±6.4
ICM cells	40.7±4.7	39.7±5.0	40.4±5.8	22.5±3.4	25.0±4.0	24.3±3.1	24.0±1.4	24.5±5.4	24.8±3.5
TE cells	86.2±12.1	87.3±11.0	92.0±7.8	108.2±12.1	98.6±8.7	109.8±8.5	102.2±12.6	103.2±8.0	100.8±6.5
ICM/TE ratio	0.48±0.11	0.46±0.06	0.44±0.05	0.21±0.04	0.25±0.03	0.22±0.01	0.24±0.02	0.24±0.05	0.25±0.04

Values are means ± standard deviation.

Table 3. Multivariate general linear model analysis: individual independent variables effects and full-factorial interaction between variables.

Dependent Variable	Group		Response		Group x Response	
	<i>F</i>	<i>P</i> - value	<i>F</i>	<i>P</i> -value	<i>F</i>	<i>P</i> -value
Zygote	0.037	0.964	1.090	0.344	0.144	0.965
Fertilization rate	0.401	0.672	1.448	0.244	0.263	0.901
Blastocyst (96h)	1.529	0.226	0.075	0.928	0.652	0.628
Blastocyst rate (96h)	0.789	0.460	0.099	0.906	0.495	0.740
Hatching (96h)	1.522	0.227	0.370	0.693	1.258	0.298
Blastocyst (120h)	0.638	0.532	0.873	0.424	0.182	0.947
Blastocyst rate (120h)	0.205	0.816	1.367	0.263	0.139	0.967
Hatching (120h)	0.329	0.721	0.319	0.729	0.981	0.426
<i>D Score</i>	0.765	0.470	0.127	0.881	1.787	0.145
Total cell count	0.400	0.673	0.931	0.400	0.788	0.538
ICM cells	85.580	0.000	0.179	0.837	0.281	0.889
TE cells	17.015	0.000	1.223	0.302	1.451	0.230
ICM/TE ratio	122.377	0.000	0.430	0.653	1.111	0.361

Table 4. Effects of pre- and postnatal exposure of five-month-old Swiss Albino mice to filtered (FA) and/or ambient (AA) air on the pattern of cell allocation (inner cell mass, ICM; trophectoderm, TE) in blastocysts at day 5 of *in vitro* development. Exposure protocols with mean values of dependent variables showing no difference between them were grouped in homogeneous subsets.

Dependent Variable	Subset 1		Subset 2	
	Exposure	Mean±SD	Exposure	Mean±SD
ICM	FA-AA	23.94±3.58	FA-FA	40.29±5.00
	AA-AA	24.53±3.91		
TE	FA-AA	104.89±10.84	FA-FA	89.04±9.78
	AA-AA	101.90±7.98		
ICM/TE ratio	FA-AA	0.23±0.04	FA-FA	0.46±0.07
	AA-AA	0.24±0.04		

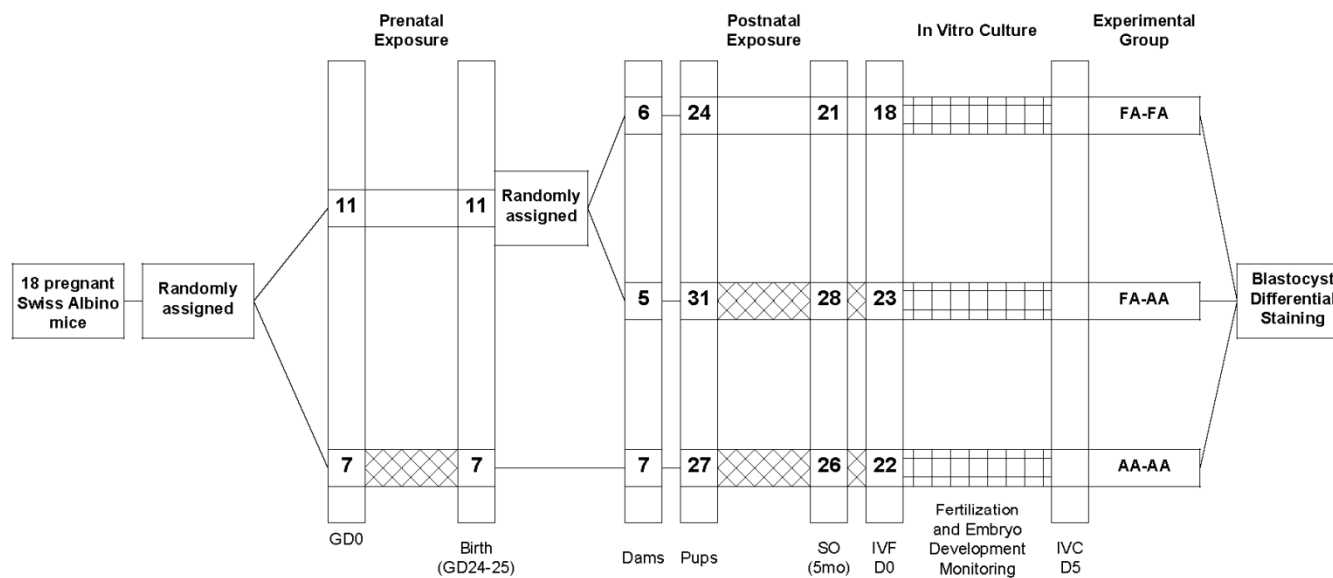
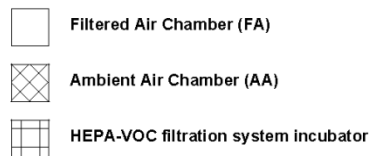
p<0.05, subset 1 vs. subset 2 (*post hoc* Tukey's HSD test, after MANOVA)

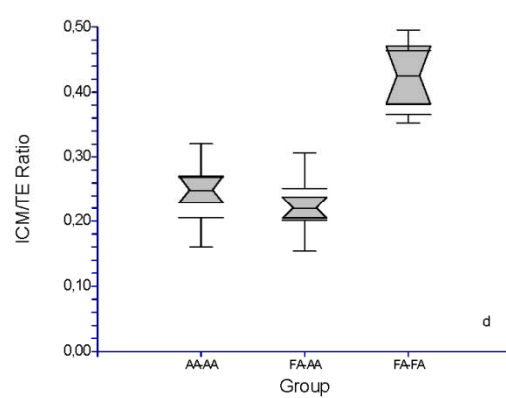
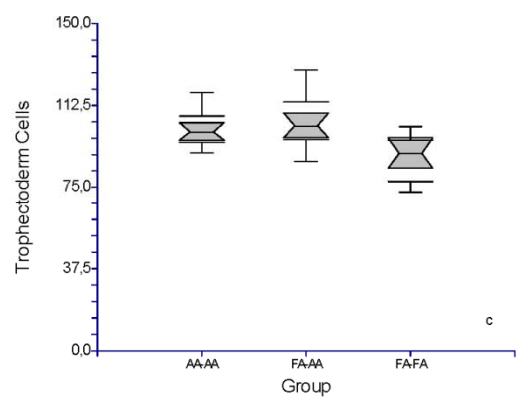
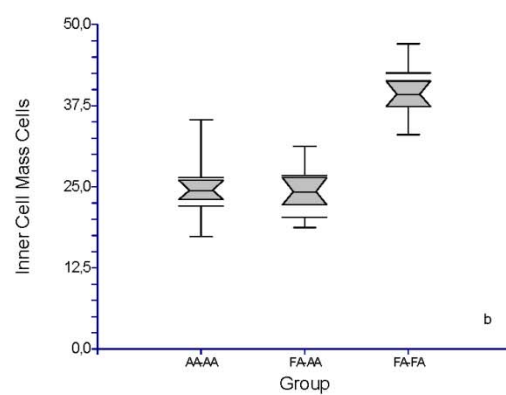
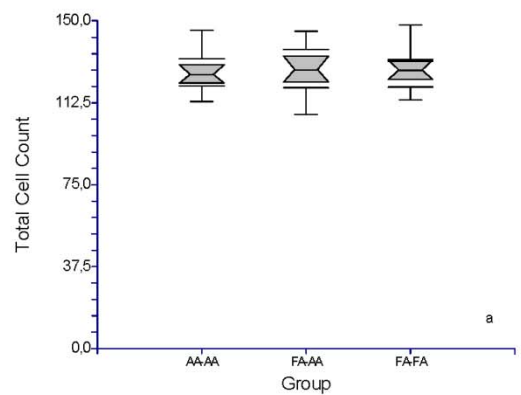
Legends:

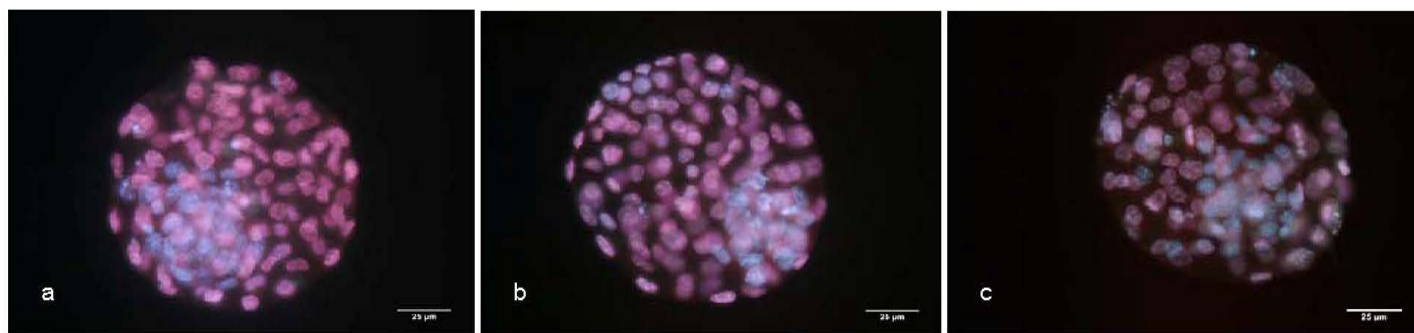
Figure 1. Experimental design (boxed values represent the number of female mice). GD = gestation day; SO = superovulation; IVF = *in vitro* fertilization; D = day; IVC = *in vitro* culture.

Figure 2. Notched box plots depicting the distribution of the total number of cells (a), the number of inner cell mass (ICM) cells (b), the number of trophectoderm (TE) cells (c), and the ratio of ICM to TE cells (d) in blastocysts produced by *in vitro* fertilization from five-month-old Swiss albino female mice exposed pre- and postnatally to filtered (FA) and/or ambient (AA) air. The top and bottom of the box are the 25th and 75th percentiles and the line drawn through its middle represents the median (the 50th percentile). The length of the box is thus the interquartile range (IQR). The upper adjacent value is the largest observation that is less than or equal to the 75th percentile plus 1.5 times IQR. The lower adjacent value is the smallest observation that is greater than or equal to the 25th percentile minus 1.5 times IQR.

Figure 3. Differential staining of blastocysts obtained from five-month-old Swiss albino female mice exposed pre- and postnatally to filtered (FA) and/or ambient (AA) air: (a) FA-FA group, (b) FA-AA group, and (c) AA-AA group. Blue and pink colors indicate inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) cells, respectively.







7. REFERÊNCIAS

1. Perin P, Maluf M, Czeresnia C, Sousa P. The effect of recombinant human luteinizing hormone on oocyte/embryo quality and treatment outcome in down-regulated women undergoing in vitro fertilization. *Einstein*. 2005;3(2):96-105.
2. Zerhouni E. Translational and clinical science — time for a new vision. *New Engl J Med*. 2005;353(15):1621-3.
3. Schwartz D. Physician-scientists in environmental health. *Environ Health Perspect*. 2005;113(12):A796.
4. Ming-Ho Y. *Environmental toxicology: impacts of environmental toxicants on living systems* Boca Raton, Florida: CRC Press LLC; 2001.
5. Samet J, Dominici F, Curriero F, Coursac I, Zeger S. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987–1994. *N Engl J Med*. 2000;343:1742-9.
6. Martins LC, Pereira LAA, Lin CA, Santos UP, Prioli G, Luiz OdC, et al. The effects of air pollution on cardiovascular diseases: lag structures. *Rev Saúde Pública*. 2006;40(4):677-83.
7. Franchini M, Mannucci P. Short-term effects of air pollution on cardiovascular diseases: outcomes and mechanisms. *J Thromb Haemost*. 2007;5(11):2169-74.
8. Pope C. Respiratory disease associated with community air pollution and a steel mill, Utah Valley. *Am J Public Health*. 1989;79(5):623-8.
9. Dockery D, Pope C, Xu X, Spengler J, Ware J, Fay M, et al. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med*. 1993;329(24):1753-9.
10. Saldiva P, Pope C, Schwartz J, Dockery D, Lichtenfels A, Salge J, et al. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Arch Environ Health*. 1995;50(2):159-63.
11. Atkinson R, Anderson H, Sunyer J, Ayres J, Baccini M, Vonk J, et al. Acute Effects of Particulate Air Pollution on Respiratory Admissions. Results from APHEA 2 Project. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1860–6.
12. Conceição G, Miraglia S, Kishi H, Saldiva P, Singe J. Air pollution and child mortality: a time-series study in São Paulo, Brazil *Environ Health Perspect*. 2001;109(Suppl 3):347-50.
13. Brook R, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, et al. Air pollution and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. *Circulation*. 2004;109(21):2655-71.
14. Walker B, Mouton C. Environmental influences on cardiovascular health. *J Natl Med Assoc*. 2008;100(1):98-102.
15. Boffetta P. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat Res*. 2006;608(2):157-62.

16. Belpomme D, Irigaray P, Hardell L, Clapp R, Montagnier L, Epstein S, et al. The multitude and diversity of environmental carcinogens. *Environ Res*. 2007;105(3):414-29.
17. Bartra J, Mullol J, delCuvillo A, Dávila I, Ferrer M, Jáuregui I, et al. Air pollution and allergens. *J Investig Allergol Clin Immunol*. 2007;17(Suppl 2):3-8.
18. Ciencewicky J, Jaspers I. Air pollution and respiratory viral infection. *Inhal Toxicol*. 2007;19(14):1135-46.
19. Dubowsky S, Suh H, Schwartz J, Coull B, Gold D. Diabetes, obesity, and hypertension may enhance associations between air pollution and markers of systemic inflammation. *Environ Health Perspect* 2006 Jul;114(7):992-8. 2006.
20. Pope C. Air pollution and health - good news and bad. *N Engl J Med* 351:1132, September 9, 2004. 2004;351:1132-4.
21. Gauderman W, Avol E, Gilliland F, Vora H, Thomas D, Berhane K, et al. The effect of air pollution on lung development from 10 to 18 years of age. *N Engl J Med*. 2004;351:1057-67.
22. Barnett A, Williams G, Schwartz J, Neller A, Best T, Petroeschevsky A, et al. Air pollution and child respiratory health. A case-crossover study in Australia and New Zealand. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;171:1272-8.
23. Pereira L, Loomis D, Conceição G, Braga A, Areas R, Kishi H, et al. Association between air pollution and intrauterine mortality in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect*. 1998;106:325-9.
24. Lee B, Ha E, Park H, Kim Y, Hong Y, Kim H, et al. Exposure to air pollution during different gestational phases contributes to risks of low birth weight. *Hum Reprod*. 2003;18:638-43.
25. Srám R, Binková B, Dejmek J, Bobak M. Ambient air pollution and pregnancy outcomes: a review of the literature. *Environ Health Perspect*. 2005;113:375-82.
26. Daar A, Merali Z. Infertility and social suffering: the case of ART in developing countries. In: Vayena E, Rowe P, Griffin P, editors. *Current practices and controversies in assisted reproduction: report of a WHO meeting*. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2002. p. 15-21.
27. Templeton A, Fraser C, Thompson B. The epidemiology of infertility in Aberdeen. *BMJ*. 1990;301(6744):148-52.
28. Lass A. Investigation of the infertile couple for assisted conception. In: Brinsden P, editor. *In vitro fertilization and assisted reproduction The Bourn Hall guide to clinical and laboratory practice*. New York: The Parthenon Publishing Group Inc; 1999. p. 13-26.
29. Tatone C. Oocyte senescence: A firm link to age-related female subfertility. *Gynecol Endocrinol*. 2008;24(2):59-63.
30. Botting B, Dunnell K. Trends in fertility and contraception in the last quarter of the 20th century. *Popul Trends*. 2000;100:32-9.
31. Leridon H. Can assisted reproduction technology compensate for the natural decline in fertility with age? A model assessment. *Hum Reprod*. 2004;19(7):1548-53.

32. Hamilton B, Martin J, Sutton P. Births: Preliminary data for 2002. National vital statistics reports; vol 51 no 11. Hyattsville, Maryland: National Center for Health Statistics; 2003.
33. Ritz B, Yu F, Fruin S, Chapa G, Shaw G, Harris J. Ambient air pollution and risk of birth defects in Southern California. *Am J Epidemiol.* 2002;155:17-25.
34. Rubes J, Selevan S, Evenson D, Zudova D, Vozdova M, Zudova Z, et al. Episodic air pollution is associated with increased DNA fragmentation in human sperm without other changes in semen quality. *Hum Reprod.* 2005;20(10):2776-83.
35. Lichtenfels A, Gomes J, Pieri P, Miraglia S, Hallak J, Saldiva P. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil. *Fertil Steril.* 2007;87:230-2.
36. Ritz B, Wilhelm M, Hoggatt K, Ghosh J. Ambient air pollution and preterm birth in the environment and pregnancy outcomes study at the University of California, Los Angeles. *Am J Epidemiol.* 2007;166:1045-52.
37. Ritz B, Wilhelm M. Ambient air pollution and adverse birth outcomes: methodologic issues in an emerging field. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;102(2):182-90.
38. Silva I, Lichtenfels A, Pereira L, Saldiva P. Effects of ambient levels of air pollution generated by traffic on birth and placental weights in mice. *Fertil Steril.* 2008;doi:10.1016/j.fertnstert.2007.10.001.
39. Adamopoulos D, Pappa A, Nicopoulou S, Andreou E, Karamertzanis M, Michopoulos J, et al. Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the Greater Athens area during the period 1977-1993. *Hum Reprod.* 1996;11(9):1936-41.
40. Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkeblek N. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ.* 1992;305:609-13.
41. Perreault S, Rubes J, Robbins W, Evenson D, Selevan S. Evaluation of aneuploidy and DNA damage in human spermatozoa: applications in field studies. *Andrologia.* 2000;32(4-5):247-54.
42. Selevan S, Borkovec L, Slott V, Zudová Z, Rubes J, Evenson D, et al. Semen quality and reproductive health of young Czech men exposed to seasonal air pollution. *Environ Health Perspect.* 2000;108(9):887-94.
43. Borini A, Tarozzi N, Bizzaro D, Bonu M, Fava L, Flamigni C, et al. Sperm DNA fragmentation: paternal effect on early post-implantation embryo development in ART. *Hum Reprod.* 2006;21(11):2876-81.
44. Lin M, Lee R, Li S, Lu C, Sun F, Hwu Y. Sperm chromatin structure assay parameters are not related to fertilization rates, embryo quality, and pregnancy rates in in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection, but might be related to spontaneous abortion rates. *Fertil Steril.* 2007;doi:10.1016/j.fertnstert.2007.06.018.
45. Dolk H, Vrijheid M. The impact of environmental pollution on congenital anomalies. *Br Med Bull.* 2003;68:25-45.
46. Liu S, Krewski D, Shi Y, Chen Y, Burnett R. Association between gaseous ambient air pollutants and adverse pregnancy outcomes in Vancouver, Canada. *Environ Health Perspect.* 2003;111(14):1773-8.

47. Gouveia N, Bremner S, Novaes H. Association between ambient air pollution and birth weight in São Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health*. 2004;58(1):11-7.
48. Somers C, Yauk C, White P, Parfett C, Quinn J. Air pollution induces heritable DNA mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(25):15904-7.
49. Somers C, McCarry B, Malek F, Quinn J. Reduction of particulate air pollution lowers the risk of heritable mutations in mice. *Science*. 2004;304(5673):1008-10.
50. Yauk C, Polyzos A, Rowan-Carroll A, Somers C, Godschalk R, VanSchooten F, et al. Germ-line mutations, DNA damage, and global hypermethylation in mice exposed to particulate air pollution in an urban/industrial location. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(2):605-10.
51. Mohallem S, Lobo D, Pesquero C, Assunção J, Andre P, Saldiva P, et al. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. *Environ Res*. 2005;98(2):196-202.
52. Silva I, Lichtenfels A, Saldiva P. Increase abortion in mice exposed to environmental air pollution in Sao Paulo. *Fertil Steril*. 2005;84(Suppl 1):S404-5.
53. Mendola P, Messer L, Rappazzo K. Science linking environmental contaminant exposures with fertility and reproductive health impacts in the adult female. *Fertil Steril*. 2008;89:e81-e94.
54. Mather FJ, White LE, Langlois EC, Shorter CF, Swalm CM, Shaffer JG, et al. *Statistical Methods for Linking Health, Exposure, and Hazards*. *Environ Health Perspect*. 2004;112:1440-5.
55. Chapin R, Robbins W, Schieve L, Sweeney A, Tabacova S, Tomashek K. Off to a good start: the influence of pre- and periconceptional exposures, parental fertility, and nutrition on children's health. *Environ Health Perspect*. 2004;112(1):69-78.
56. Cook J, Davis B, Cai S, Barrett J, Conti C, Walker C. Interaction between genetic susceptibility and early-life environmental exposure determines tumor-suppressor-gene penetrance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(24):8644-9.
57. Foster W. Fetal and early postnatal environmental contaminant exposures and reproductive health effects in the female. *Fertil Steril*. 2008;89(Suppl 1):e53-e4.
58. Perin P, Maluf M, Januario D, Saldiva P. Comparison of the efficacy of two commercially available media for culturing one-cell embryos in the in vitro fertilization (IVF) mouse model. *Fertil Steril*. 2008;doi:10.1016/j.fertnstert.2007.09.062.
59. Lane M, Gardner D. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil*. 1997;109(1):153-64.
60. Richter K, Harris D, Daneshmand S, Shapiro B. Quantitative grading of a human blastocyst: optimal inner cell mass size and shape. *Fertil Steril*. 2001;76:1157-67.

61. Kovacic B, Vlaisavljevic V, Reljic M, Sajko M. Developmental capacity of different morphological types of day 5 human morulae and blastocysts. *Reprod Biomed Online*. 2004;8(6):687-94.
62. Handyside A, Hunter S. A rapid procedure for visualising the inner cell mass and trophectoderm nuclei of mouse blastocysts in situ using polynucleotide-specific fluorochromes. *J Exp Zool*. 1984;231:429-34.
63. Thouas G, Korfiatis N, French A, Jones G, Trounson A. Simplified technique for differential staining of inner cell mass and trophectoderm cells of mouse and bovine blastocysts. *Reprod BioMed Online*. 2001; 3(1):25-9.
64. Salam M, Millstein J, Li Y, Lurmann F, Margolis H, Gilliland F. Birth outcomes and prenatal exposure to ozone, carbon monoxide, and particulate matter: results from the children's health study. *Environ Health Perspect*. 2005;113:1638-44.
65. Kannan S, Misra D, Dvonch J, 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;114:1636-42.
66. Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R, editors. *Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual*. Woodbury, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2003.
67. Jobling S, Beresford N, Nolan M, Rodgers-Gray T, Brighty G, Sumpter J, et al. Altered sexual maturation and gamete production in wild roach (*Rutilus rutilus*) living in rivers that receive treated sewage effluents. *Biol Reprod*. 2002;66(2):272-81.
68. Jobling S, Williams R, Johnson A, Taylor A, Gross-Sorokin M, Nolan M, et al. Predicted exposures to steroid estrogens in U.K. rivers correlate with widespread sexual disruption in wild fish populations. *Environ Health Perspect*. 2006;114(Suppl 1):32-9.
69. Parrott J, Blunt B. Life-cycle exposure of fathead minnows (*Pimephales promelas*) to an ethinylestradiol concentration below 1 ng/L reduces egg fertilization success and demasculinizes males. *Environ Toxicol*. 2005;20(2):131-41.
70. Rooney A, Crain D, Woodward A, Guillette L. Seasonal variation in plasma sex steroid concentrations in juvenile American alligators. *Gen Comp Endocrinol*. 2004;135(1):25-34.
71. Hakkinen K. Impact of endocrine disrupting chemicals on reproduction in Japanese quail. *Domest Anim Endocrinol*. 2005;29(2):420-9.
72. Younglai EV, Holloway AC, Foster WG. Environmental and occupational factors affecting fertility and IVF success. *Human Reproduction Update*. 2005;11(1):43-57.
73. Biggers J, McGinnis L, Raffin M. Amino acids and preimplantation development of the mouse in protein-free KSOM. *Biol Reprod*. 2000;63:281-93.
74. Summers M, McGinnis L, Lawitts J, Raffin M, Biggers J. IVF of mouse ova in a simplex optimized medium supplemented with amino acids. *Hum Reprod* 2000;15:1791-801.

75. Liu C, Lee M, Hsieh C, Huang C, Tsao H, Hsieh Y. Prostacyclin enhances mouse embryo development and hatching but not increased embryonic cell number and volume. *Fertil Steril*. 2006;86(Suppl 3):1047–52.
76. Fouladi-Nashta A, Alberio R, Kafi M, Nicholas B, Campbell K, Webb R. Differential staining combined with TUNEL labelling to detect apoptosis in preimplantation bovine embryos. *Reprod BioMed Online*. 2005;Vol 10(4):497–502.
77. Faustman E, Gohlke J, Ponce R, Lewandowski T, Seeley M, Whittaker S, et al. Experimental approaches to evaluate mechanisms of developmental toxicity. In: Hood R, editor. *Developmental and Reproductive Toxicology A Practical Approach*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, LLC; 2006. p. 15-60.
78. Hoyer P. Ovarian toxicity in small pre-antral follicles. In: Hoyer P, editor. *Ovarian Toxicology*. Boca Raton CRC Press; 2004. p. 17-39.
79. Thouas G, Trounson A, Jones G. Developmental effects of sublethal mitochondrial injury in mouse oocytes. *Biol Reprod*. 2006;74:969–77.
80. Navarro P, Liu L, Keefe D. In vivo effects of arsenite on meiosis, preimplantation development, and apoptosis in the mouse. *Biol Reprod*. 2004;70:980-5.
81. Matikainen T, Perez G, Juriscova A, Pru J, Schlezinger J, Ryu H, et al. Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet* 2001;28:355-60.
82. Matzuk M. Eggs in the balance. *Nat Genet*. 2001;28:300-1.
83. Takai Y, Canning J, Perez G, Pru J, Schlezinger J, Sherr D, et al. Bax, caspase-2, and caspase-3 are required for ovarian follicle loss caused by 4-vinylcyclohexene diepoxide exposure of female mice in vivo. *Endocrinology*. 2003;144:69-74.
84. Iwai K, Mizuno S, Miyasaka Y, Mori T. Correlation between suspended particles in the environmental air and causes of disease among inhabitants: cross-sectional studies using the vital statistics and air pollution data in Japan. *Environ Res*. 2005;99:106-17.
85. Sarnat JA, Schwartz J, Catalano PJ, Suh HH. Gaseous Pollutants in Particulate Matter Epidemiology: Confounders or Surrogates? *Environ Health Perspect*. 2001;109:1053–61.
86. Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson R, Rossant J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn*. 2006;235:2301-14.
87. Fleming T, Kwong W, Porter R, Ursell E, Fesenko I, Wilkins A, et al. The embryo and its future. *Biol Reprod*. 2004;71:1046–54.
88. Koo D, Kang Y, Choi Y, Park J, Kim H, Oh K, et al. Aberrant allocations of inner cell mass and trophectoderm cells in bovine nuclear transfer blastocysts. *Biol Reprod*. 2002;67:487-92.
89. Pampfer S. Apoptosis in rodent peri-implantation embryos: differential susceptibility of inner cell mass and trophectoderm cell lineages - a review. *Placenta*. 2000;21(Suppl A):S3-10.
90. Strumpf D, Mao C, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, et al. Cdx2 is required for correct cell fate specification and

- differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development*. 2005;132(9):2093-102.
91. Nemr A, Shawaf T, Sabatini L, Wilson C, Lower A, Grudzinskas J. Effect of smoking on ovarian reserve and ovarian stimulation in in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod*. 1998;13(8):2192-8.
92. Mlynarcikova A, Fickova M, Scsukova S. Ovarian intrafollicular processes as a target for cigarette smoke components and selected environmental reproductive disruptors. *Endocrine Regulations*. 2005;39:20-31.
93. Messerlian G, Harlow B. The influence of depression, body mass index, and smoking on serum inhibin B levels in late reproductive-aged women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(4):1496-500.
94. Prospero F, Luzi S, Iacopini Z. Cigarette smoking damages women's reproductive life. *Reprod Biomed Online* 2004;8(2):246-7.
95. Reynolds R, Obermeyer C. Age at natural menopause in Spain and the United States: results from the DAMES project. *Am J Hum Biol*. 2005;17(3):331-40.
96. Kinney A, Kline J, Levin B. Alcohol, caffeine and smoking in relation to age at menopause. *Maturitas*. 2006;54 (1):27-38.
97. Kinney A, Kline J, Kelly A, Reuss M, Levin B. Smoking, alcohol and caffeine in relation to ovarian age during the reproductive years. *Hum Reprod*. 2007;22(4):1175–85.
98. Valdez K, Petroff B. Potential roles of the aryl hydrocarbon receptor in female reproductive senescence. *Reprod Biol*. 2004;4(3):243-58.
99. Zenzes M, Reed T, Casper R. Effects of cigarette smoking and age on the maturation of human oocytes. *Hum Reprod*. 1997;12(8):1736–41.
100. El-Nemr A, Al-Shawaf T, Sabatini L, Wilson C, Lower A, Grudzinskas J. Effect of smoking on ovarian reserve and ovarian stimulation in in-vitro fertilization and embryo transfer. *Hum Reprod* 1998;13(8):2192–8.
101. Ness R, Grisso J, Hirschinger N, Markovic N, Shaw L, Day N, et al. Cocaine and tobacco use and the risk of spontaneous abortion. *N Engl J Med*. 1999;340:333-9.
102. Neal M, Hughes E, Holloway A, Foster W. Sidestream smoking is equally as damaging as mainstream smoking on IVF outcomes. *Hum Reprod*. 2005;20(9):2531–5.
103. Motejlek K, Palluch F, Neulen J, Grümmer R. Smoking impairs angiogenesis during maturation of human oocytes. *Fertil Steril*. 2006;86:186–91.
104. Gruber I, Just A, Birner M, Löscher A. Effect of a woman's smoking status on oocyte, zygote, and day 3 pre-embryo quality in in vitro fertilization and embryo transfer program. *Fertil Steril*. 2007;doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.06.108.
105. Wright K, Trimarchi J, Allsworth J, Keefe D. The effect of female tobacco smoking on IVF outcomes. *Hum Reprod*. 2006;21(11):2930–4.
106. Jurisicova A, Taniuchi A, Li H, Shang Y, Antenos M, Detmar J, et al. Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons diminishes murine ovarian reserve via induction of Harakiri. *J Clin Invest*. 2007;117:3971–8.

107. Sexton K, Jeffries H, Jang M, Kamens R, Doyle M, Voicu I, et al. Photochemical products in urban mixtures enhance inflammatory responses in lung cells. *Inhal Toxicol.* 2004;16(Suppl 1):107-14.
108. Carson R. *Silent spring*. New York: Houghton Mifflin Company; 1962.
109. Guillette L, Edwards T. Environmental influences on fertility: can we learn lessons from studies of wildlife? *Fertil Steril.* 2008;89:e21-4.
110. Woodruff T, Carlson A, Schwartz J, Giudice L. Proceedings of the summit on environmental challenges to reproductive health and fertility: executive summary. *Fertil Steril.* 2008;89(Suppl 1):e1-20.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)