

Paulo Marcelo Perin

**Efeitos da exposição pré-concepcional de curta
duração ao material particulado ambiental sobre o
mecanismo reprodutivo feminino**

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.

Paulo Marcelo Perin

Efeitos da exposição pré-concepcional de curta duração ao material particulado ambiental sobre o mecanismo reprodutivo feminino

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

Perin, Paulo Marcelo

Efeitos da exposição pré-concepcional de curta duração ao material particulado ambiental sobre o mecanismo reprodutivo feminino / Paulo Marcelo Perin. -- 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.Emissões de veículos 3.Material particulado
4.Fertilização *in vitro*/métodos 5.Transferência embrionária/métodos
6.Desenvolvimento embrionário 7.Blastocisto 8.Fase folicular 9.Gravidez
10.Taxa de abortos 11.Camundongos

USP/FM/SBD-200/08

DEDICATÓRIA

Dedicado esta tese à minha mãe,
Nanete, por seu incansável apoio, à
memória do meu pai, Ecio, que
embora não tenha tido a
oportunidade de ver esta realização
em sua vida, sempre esteve
presente em meus pensamentos
durante esta longa jornada, e à
querida memória da minha avó
Albertina, a qual ficaria muito
orgulhosa com o título de “doutor” do
seu neto.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, por ter me concedido a liberdade de pensamento e os recursos necessários para a elaboração e execução da minha linha de pesquisa. Eu não poderia imaginar pessoa melhor para ter como orientador.

À minha querida esposa, Mariangela, sempre ao meu lado apoiando e participando ativamente em todos os meus projetos, por mais insanos que parecessem (como o doutorado que os dois fizeram simultaneamente). Sem o seu encorajamento, este projeto não teria sido completado. A você, o meu eterno amor.

Aos meus amados filhos, Marcela e Paulo Otavio, pelo amor e paciência, particularmente nos inúmeros finais de semana que passei mais tempo com meu computador do que com eles.

Aos meus irmãos, Daniel, Ecio e Luís Fernando, que, após obterem seus títulos acadêmicos na ordem inversa de nascimento, mostraram-me que eu não deveria perder as esperanças.

Ao meu cunhado, Prof. Dr. Fauze Maluf Filho, que me mostrou os caminhos da vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Michael C. Summers, ao qual sou extremamente grato pelos comentários e críticas sobre o meu projeto “Modelo Animal”, que foram fundamentais para a elaboração das respostas aos revisores do manuscrito deste projeto.

À Dra. Ingrid Ramos Rocha e Silva, pela paixão e estímulo que me fizeram retornar 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, pelos encontros semanais nos quais a busca de idéias espontâneas gerou o conjunto de soluções para as análises estatísticas dos meus diferentes projetos.

À Mariangela Macchione, pelo empenho em obter as amostras e as análises químicas do pó de diesel, utilizados no meu projeto “Instilação Nasal”.

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 para a elaboração desta linha de pesquisa.

“Sob condições rigorosamente controladas de pressão, temperatura, umidade e de outras variáveis, o organismo se comporta como bem lhe entender”.

Anônimo

SUMÁRIO

Listas

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Linhas de pesquisa desenvolvidas.....	4
1.2 Partículas de exaustão do diesel.....	6
1.3 Partículas de exaustão do diesel e saúde reprodutiva.....	10
1.4 Desafios.....	16
2 OBJETIVOS	30
2.1 Projeto Modelo Animal.....	31
2.2 Projeto Instilação Nasal.....	32
2.3 Projeto Poluição Ambiental Particulada e FIVETE.....	33
3 MÉTODOS	34
4 RESULTADOS	35
4.1 Projeto Modelo Animal.....	36
4.2 Projeto Instilação Nasal.....	38
4.3 Projeto Poluição Ambiental Particulada e FIVETE.....	40
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÕES	69
6.1 Projeto Modelo Animal.....	70
6.2 Projeto Instilação Nasal.....	71

6.3 Projeto Poluição Ambiental Particulada e FIVETE.....	73
7 ANEXOS.....	75
7.1 Anexo A.....	76
7.2 Anexo B.....	107
7.3 Anexo C.....	140
8 REFERÊNCIAS.....	178

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito toxicologicamente relevante e respectivo impacto biológico dos principais componentes da fase gasosa e particulada das emissões de motores a diesel (modificado de <i>Health Assessment Document for Diesel Engine Exhaust – Environmental Protection Agency, 2002</i>).....	7
Projeto Modelo Animal	
Tabela 1 – Capacidade de desenvolvimento dos oócitos de camundongo fertilizados <i>in vitro</i> após 96 e 120 horas de cultivo nos meios G1/G2 e KSOM.....	103
Tabela 2 – Distribuição dos diferentes estágios do processo de eclosão dos blastocistos de camundongo cultivados nos meios G1/G2 e KSOM 120 horas após a inseminação....	104
Projeto Instilação Nasal	
Tabela 1 – Componentes orgânicos e metais presentes nas partículas de exaustão do diesel nativas (PDE-N) e ácido-extraídas (PED-AE).....	134
Tabela 2 – Efeitos da exposição de curta duração de fêmeas de camundongo às soluções controle, partículas de exaustão do diesel nativas (PED-N) e PED ácido-extraídas (PED-AE) 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.....	135
Tabela 3 – Modelo geral de análise linear multivariada: efeitos individuais das variáveis independentes e interação fatorial completa entre variáveis.....	136

Tabela 4 – Efeitos da exposição de curta duração de fêmeas de camundongo às soluções controle, partículas de exaustão do diesel nativas (PED-N) e PED ácido-extraídas (PED-AE) sobre a especificação das linhagens celulares e a morfologia da massa celular interna (MCI) 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.....	137
---	------------

Projeto Poluição Ambiental Particulada e FIVETE

Tabela 1 – Resposta ovariana à indução da ovulação de acordo com o período de exposição ao material particulado ambiental (MP ₁₀) durante a fase folicular e faixa etária de mulheres submetidas à FIVETE.....	171
Tabela 2 – Efeitos da exposição aos níveis de material particulado (MP ₁₀) nos períodos Q ₁₋₃ e Q ₄ durante a fase folicular sobre os parâmetros clínicos e laboratoriais de acordo com a faixa etária de mulheres submetidas à FIVETE. Para explicação da taxa de desenvolvimento embrionário (TDE), ver texto.....	172
Tabela 3 – Efeitos da exposição aos níveis de material particulado (MP ₁₀) nos períodos Q ₁₋₃ e Q ₄ durante a fase folicular sobre o sucesso dos ciclos de FIVETE de acordo com a faixa etária e resposta ovariana.....	173
Tabela 4 – Resultado da gestação de acordo com o período de exposição ao material particulado (MP ₁₀) após a concepção natural ou através de FIVETE.....	174

LISTA DE FIGURAS

Projeto Modelo Animal

- Figura 1** – Gráfico de caixas demonstrando a distribuição do número de células da massa celular interna (MCI) (a), do número de células do trofoectoderma (TE) (b), da razão MCI/TE (c) e do número total de células (d) em blastocistos cultivados por 96 horas após a inseminação dos oócitos em meio de cultura G1/G2 ou KSOM. Para a explicação das caixas, ver texto..... 106

Projeto Instilação Nasal

- Figura 1** – Gráfico de caixas demonstrando a distribuição do número total de células (a), do número de células da massa celular interna (MCI) (b), do número de células do trofoectoderma (TE) (c) e da razão MCI/TE (d), em blastocistos produzidos através da fertilização *in vitro* de oócitos de fêmeas de camundongo da linhagem Swiss Albino expostas às soluções controle, de partículas de exaustão do diesel nativas (PED-N) e de PED ácido-extraídas (PED-AE). 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..... 139

Projeto Poluição Ambiental Particulada e FIVETE

- Figura 1** – Média mensal e intervalos de confiança 95% das concentrações de material particulado (MP₁₀, µg/m³) de 1997 a 2006 na cidade de São Paulo, São Paulo, Brasil..... 176

Figura 2 – Razão de chance e intervalos de confiança 95% para a perda gestacional inicial após a concepção natural ou assistida de acordo com a mudança da faixa de interquartis dos níveis ambientais de material particulado (MP₁₀). O primeiro quartil (Q1) representa o grupo de referência.....

LISTA DE ABREVIATURAS

AhR	receptor de aril-hidrocarbono
ANOVA	análise de variância
Bax	proteína X associada ao Bcl2
Cdx2	<i>gene Caudal-type homeobox 2</i>
CI	intervalo de confiança
COC	complexo cúmulus-oócito
DNA	ácido desoxirribonucléico
Dr.	doutor
Dra.	doutora
E₂	estradiol
eCG	gonadotrofina coriônica eqüina
ED	exaustão do diesel
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
et al.	e outros
FIV	fertilização <i>in vitro</i>
FIVETE	fertilização <i>in vitro</i> e transferência de embriões
GnRH-a	agonista do hormônio liberador de gonadotrofinas
hCG	gonadotrofina coriônica humana
HMG	gonadotrofina de mulher menopausada
HPAs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HSA	soroalbumina humana

HSD	diferença honestamente significativa
HTF	fluido tubário humano
ICSI	injeção intracitoplasmática de espermatozóide
IP	iodeto de propídeo
IQR	faixa interquartil
IU	unidade internacional
KSOM	meio simples otimizado enriquecido com potássio
LOD	limite de detecção
LPM	data da última menstruação
MII	metáfase II
MANOVA	análise de multivariância
MAPKs	proteínas quinase ativadas por mitógeno p38
MCI	massa celular interna
mHTF	fluido tubário humano modificado
MNB	blastômero multinucleado
MP	material particulado
MP_{2,5}	material particulado com diâmetro aerodinâmico < 2,5µm
MP₁₀	material particulado com diâmetro aerodinâmico < 10µm
mRNA	ácido ribonucléico mensageiro
Nanog	fator de transcrição homeobox Nanog
Nítro-HPAs	hidrocarbonetos policíclicos nitro aromáticos
NOx	óxidos de nitrogênio
OCM	meio condicionado de oócitos
Oct4	<i>octamer-4</i>

OR	razão de chance
PED	partículas de exaustão do diesel
PED-N	partículas de exaustão do diesel nativas
PED-AE	partículas de exaustão do diesel ácido-extraídas
Prof.	professor
rhFSH	hormônio folículo-estimulante humano recombinante
ROS	espécies reativas de oxigênio
SAPK/JNK	fosfoproteínas quinase (Jun) ativadas por estresse
SD	desvio padrão
SOM	meio otimizado simples
SOx	óxidos de enxofre
SSS	suplemento substituto de soro
TE	trofoectoderma
TX-100	Triton X-100
βhCG	subunidade beta da gonadotrofina coriônica humana

LISTA DE SIGLAS

ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
EUA	Estados Unidos da América
IAG	Instituto de Astronomia e Geofísica
NIEHS	<i>National Institute of Environmental Health Sciences</i>
NIH	<i>National Institutes of Health</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE SÍMBOLOS

CO	monóxido de carbono
CO₂	dióxido de carbono
HNO₃	ácido nítrico
g	força da gravidade
m²/g	metro quadrado por grama
m³	metro cúbico
MIU/mL	mili-unidade internacional por mililitro
mg	miligrama
mg/mL	miligrama por mililitro
mL	mililitro
mm	milímetro
mmol/L	milimol por litro
min	minuto
N₂	nitrogênio
n	número
ng/g	nanograma por grama
nm	nanômetro
NO₂	dióxido de nitrogênio
O₂	oxigênio
pg/mL	picograma por mililitro
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
µg/m³	micrograma por metro cúbico
µg/mL	micrograma por mililitro
µm	micrometro
µg	micrograma
µL	microlitro
%	porcentagem
χ²	qui-quadrado

RESUMO

Perin, P.M. Efeitos da exposição pré-concepcional de curta duração ao material particulado ambiental sobre o mecanismo reprodutivo feminino [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 185p.

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 pré-concepcional de curta duração às partículas de exaustão do diesel (PED) e à poluição ambiental particulada sobre a função ovariana, o desenvolvimento embrionário inicial e resultado gestacional utilizando um modelo experimental e um epidemiológico. O objetivo do primeiro projeto desta tese foi avaliar os efeitos de dois meios de cultura comerciais no desenvolvimento de oócitos de camundongo fertilizados *in vitro* até o estágio de blastocisto. Zigotos obtidos de fêmeas de camundongo de 8 semanas de idade submetidas à indução da ovulação foram cultivados *in vitro* até o estágio de blastocisto em meio simples otimizado enriquecido com potássio (KSOM) ou meio G1/G2. A porcentagem de zigotos que se desenvolveu até o estágio de blastocisto 96 e 120 horas após a inseminação e que sofreu eclosão parcial ou completa no quinto dia de cultivo foi significativamente maior no grupo KSOM. O número médio de células da massa celular interna (MCI) foi $11,7 \pm 4,0$ e $9,2 \pm 5,2$ para os zigotos cultivados nos grupos KSOM e G1/G2, respectivamente, mostrando um número significativamente maior de células MCI em blastocistos derivados da cultura no meio KSOM. Concluímos que o meio KSOM comercialmente disponível é superior ao meio seqüencial G1/G2 para o cultivo de zigotos até o estágio de blastocisto

no modelo de fertilização *in vitro* (FIV) em camundongos. No segundo projeto que compõe esta tese, o objetivo foi avaliar os efeitos da exposição de curta duração às PED sobre a fertilização, desenvolvimento embrionário e segregação das linhagens celulares em blastocistos pré-implantacionais utilizando o modelo de FIV em camundongo. A instilação intranasal de água destilada (grupo controle), de PED nativas (grupo PED-N) ou de PED ácido-extraídas (grupo PED-AE), realizada uma vez ao dia por três dias, iniciada no primeiro dia de administração de gonadotrofinas, foi realizada em fêmeas de camundongo com oito semanas de idade. Os pontos de avaliação reprodutivos analisados incluíram a resposta ovariana a 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 trofoectoderma (TE), e a morfologia da MCI. A resposta ovariana não foi afetada pelo protocolo de exposição. Um efeito multivariado para a exposição às PED-N e PED-AE na coloração diferencial de blastocistos e na morfologia da MCI, mas não para a FIV ou desenvolvimento embrionário, foi observado. A contagem celular da MCI e a razão MCI/TE em blastocistos produzidos no grupo controle foram significativamente maiores do que em blastocistos produzidos nos grupos PED-N e PED-AE. O número total de células dos blastocistos foi similar entre os grupos. O escore que representa a morfologia da massa celular interna foi significativamente maior no grupo controle quando comparado àquele encontrado nos grupos PED-N e PED-AE. Baseando-se nesses resultados, nosso estudo sugere que a exposição de curta duração às PED pode afetar negativamente o processo reprodutivo através do distúrbio da especificação das linhagens celulares do embrião em estágio de blastocisto. Finalmente, a exposição a toxinas ambientais pode ser inevitável durante o período pré-concepcional em grandes centros urbanos e seus efeitos são desconhecidos. Portanto, o propósito do terceiro projeto que compõe esta tese foi avaliar os potenciais efeitos da exposição de curta duração à poluição ambiental particulada durante a fase folicular sobre os resultados clínicos, laboratoriais e gestacionais de casais submetidos à fertilização *in vitro* e transferência de embriões (FIVETE). Trezentos e quarenta e oito mulheres submetidas ao seu primeiro ciclo de FIVETE foram avaliadas retrospectivamente neste estudo coorte, caso-controle casado. A exposição ao material particulado ambiental (MP) durante a fase folicular de cada paciente foi estimada baseando-se em dados da poluição ambiental (1997-2006) categorizados em período Q_{1-3} ($\leq 56,72 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e Q_4 ($>56,72 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Desse grupo, 177 pacientes que engravidaram (casos) foram comparadas com 354 mulheres que conceberam espontaneamente (controles). Os principais pontos de avaliação incluíram a resposta ovariana às gonadotrofinas, o número de oócitos recuperados e as taxas de fertilização, de clivagem, de qualidade embrionária, de implantação,

de gestação, de abortamento e de nascidos vivos. Nenhum efeito da exposição a níveis elevados de MP durante a fase folicular foi observado nos resultados clínico e laboratorial, na transferência embrionária ou no sucesso dos ciclos de tratamento das pacientes submetidas à FIVETE. Mulheres expostas ao período Q₄ durante a fase folicular do ciclo de concepção apresentaram um risco significativamente maior de abortamento, independentemente do método de concepção (razão de chance: 2,58; intervalo de confiança de 95%: 1,63 – 4,07), quando comparado àquele de mulheres expostas ao período Q₁₋₃. O risco de perda da gestação aumentou 3% por unidade de aumento do valor médio do MP na fase folicular (p= 0,000). Os resultados apresentados aqui fornecem evidências para uma relação causal entre a breve exposição a níveis elevados de MP ambiente durante o período pré-concepcional e a perda gestacional inicial, independentemente do método de concepção e está associada a um aumento de 2,6 vezes no risco de abortamento. Apesar da ausência de efeitos dessa exposição sobre os resultados clínicos e laboratoriais e sobre o sucesso do tratamento, a FIVETE foi incapaz de reduzir esse risco.

Descritores: poluição do ar; emissões de veículos; material particulado; fertilização *in vitro*; transferência embrionária; desenvolvimento embrionário; blastocisto; fase folicular; gravidez; taxa de abortos; camundongos.

SUMMARY

Perin, P.M. Effects of short-term preconceptional exposure to ambient particulate matter on female reproductive function [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2008. 184p.

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 short-term preconceptional exposure to diesel exhaust particles and particulate air pollution on ovarian function, early embryo development and pregnancy outcome using experimental and epidemiological models. The objective of the first project was to examine the effects of two commercial media on the development of mouse ova fertilized *in vitro* to the blastocyst stage. One-cell embryos obtained from eight-week old superovulated mice were cultured *in vitro* up to the blastocyst stage in potassium-enriched simplex optimized medium (KSOM) or G1/G2 media. The percentage of zygotes that developed to the blastocyst stage 96 and 120 hours after insemination and that partially or completely hatched by day five of culture was significantly higher in the KSOM group. The mean number of inner cell mass (ICM) cells was 11.7 ± 4.0 and 9.2 ± 5.2 for zygotes cultured in KSOM and G1/G2 groups respectively, revealing a significantly higher cell number in the ICM of blastocysts derived from culture in KSOM medium. I concluded that commercially available KSOM medium is superior to sequential G1/G2 media for culturing one-cell embryos up to the blastocyst stage in the mouse IVF model. In the second project the objective was to evaluate the effects of short-term exposure to diesel exhaust particles on fertilization, embryo development, and cell lineage segregation in preimplantation blastocysts using the mouse IVF model. Intranasal instillation of distilled water (control group), native diesel exhaust particles (N-DEP group) or acid-extracted diesel exhaust particles (AE-DEP) once a day, for three days starting on the

first day of gonadotrophin administration was performed on eight-week old female mice. Reproductive endpoints evaluated included ovarian response to superovulation, fertilization rate, embryo development, blastocyst and hatching rates, total cell count, and proportion of cell allocation to ICM and trophoctoderm (TE), and ICM morphology. Ovarian response was not affected by the exposure protocol. A multivariate effect for exposure to N-DEP and AE-DEP on blastocyst differential staining and ICM morphology but not on IVF or embryo development was found. Cell counts in ICM and ICM/TE ratios in blastocysts produced in the control group were significantly higher than in blastocysts produced in N-DEP and AE-DEP groups. The total cell count was similar among groups. The score that represents ICM morphology was significantly higher in the control group when compared to that found in N-DEP and AE-DEP groups. Based on these results this study suggests that short-term exposure to DEP may negatively affect the reproductive process by disrupting the lineage specification at the blastocyst stage. Finally, exposure to environmental toxins may be unavoidable during the preconceptional period in large urban centers and its effects are unknown. Thus, the purpose of the third project was to assess the potential effects of short-term exposure to particulate air pollution during the follicular phase on clinical, laboratory, and pregnancy outcomes for couples undergoing IVF/ET. Three hundred forty-eight patients undergoing their first IVF/ET cycle were evaluated in this retrospective cohort-matched case-controlled single-center study. Exposure to ambient particulate matter (PM) during the follicular phase for each patient was estimated based on air pollution data (1997-2006) categorized in Q_{1-3} ($\leq 56.72 \mu\text{g}/\text{m}^3$) and Q_4 ($>56.72 \mu\text{g}/\text{m}^3$) periods. From this group 177 women who became pregnant (cases) were compared with 354 who had conceived spontaneously (controls). Main outcome measures included response to gonadotrophins, number of oocytes retrieved, fertilization, cleavage, embryo quality, implantation, pregnancy, miscarriage, and live birth rates. No effects of follicular phase exposure to high levels of PM on clinical, laboratory, embryo transfer or treatment outcome were found in women undergoing IVF/ET. Women exposed to Q_4 level PM during the follicular phase of the conception cycle had significantly higher risk of miscarriage, regardless of the method of conception (odds ratio, 2.58; 95% confidence interval: 1.63-4.07) when compared to women exposed to Q_{1-3} level PM. The risk of miscarriage increased 3% per unit increase in follicular phase PM average level ($p=0.000$). The results presented here provide evidence of a causal role for brief exposure to high levels of ambient PM during the preconceptional period in early pregnancy loss, regardless of the method of conception, with a 2.6-fold increase in risk of miscarriage. Despite the absence of effects of

this exposure on clinical, laboratory, and treatment outcome, IVF/ET was unable to reduce this risk.

Descriptors: air pollution; vehicle emissions; particulate matter; fertilization *in vitro*; embryo transfer; embryonic development; blastocyst; follicular phase; pregnancy; abortion rate; mice.

1. INTRODUÇÃO

A motivação para o nosso retorno, meu e da Mariangela Maluf, à vida universitária com o objetivo de obter o título de doutor(a) 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 59° 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 desde que nos fecharam 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 impar 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 esta 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 estes 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 este fim pudessem atender de maneira adequada, porém independente, as duas linhas de pesquisa e os recursos disponíveis usados de modo racionalizado. Os projetos da minha linha de pesquisa incluíram 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 de curta duração à poluição ambiental sobre o resultado dos ciclos de tratamento de casais inférteis submetidos à fertilização *in vitro* e transferência de embriões (FIVETE).

Os projetos da linha de pesquisa da Mariangela envolveram 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 Partículas de Exaustão do Diesel

Quando comparados aos motores a gasolina equipados com conversores catalíticos, os motores a diesel do mesmo porte, apesar de emitirem concentrações relativamente baixas de monóxido (CO) e de dióxido de carbono (CO₂) podem gerar cerca de cem vezes mais partículas por quilômetro rodado (4, 5), e são a principal fonte da poluição particulada nos ambientes urbanos. A exaustão do diesel (ED) é responsável por cerca de 90% do MP produzido pelo tráfego (6, 7) e representa uma mistura complexa de centenas de compostos orgânicos e inorgânicos que estão presentes em suas fases gasosa e particulada.

Os principais componentes de sua fase gasosa são CO, CO₂, óxidos de nitrogênio (NO_x), óxidos de enxofre (SO_x), oxigênio (O₂), nitrogênio (N₂), vapor de água e hidrocarbonetos de baixo peso molecular. Em sua fase particulada, as partículas de exaustão do diesel (PED) são compostas basicamente por carbono elementar (CE), seu principal componente, concentrações elevadas de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) adsorvidos em sua superfície e pequenas quantidades de sulfatos, nitratos, metais e outros elementos-traço (5, 7). O impacto biológico dos principais componentes das fases gasosa e particulada da ED pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1 – Efeito toxicologicamente relevante e respectivo impacto biológico dos principais componentes da fase gasosa e particulada das emissões de motores a diesel (modificado de *Health Assessment Document for Diesel Engine Exhaust – Environmental Protection Agency, 2002*) (8).

Fase de emissão	Componentes	Compostos toxicologicamente relevantes	Impacto biológico
Gasosa	Monóxido de carbono		Bloqueia captação de oxigênio.
	Dióxido de nitrogênio		Irritante do trato respiratório.
	Dióxido de enxofre		Irritante do trato respiratório.
	Hidrocarbonetos	<ul style="list-style-type: none"> Alcanos ($\leq C_4$): 1,3-butadieno 	Irritante do trato respiratório. Certos alcanos são mutagênicos e carcinogênicos.
	Aldeídos	<ul style="list-style-type: none"> Formaldeído Acetaldeído, acroleína Compostos monocíclicos aromáticos (ex.: benzeno, tolueno) Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – HPAs; ≤ 4 anéis (ex: fenantreno, fluorantreno) Nitro-HPAs; 2 ou 3 anéis (ex.: nitronaftalenos) 	Provável carcinógeno humano. Irritante do trato respiratório. Irritante ocular. O benzeno é tóxico e carcinogênico em humanos. Certos HPAs são mutagênicos e carcinogênicos.
Particulada	Carbono elementar		Certos nitro-HPAs são mutagênicos e carcinogênicos. O seu núcleo adsorve compostos orgânicos. O seu tamanho permite o transporte até os alvéolos e sistema circulatório
	Sulfatos e nitratos inorgânicos		Irritantes do trato respiratório.
	HPAs (≥ 4 anéis)	<ul style="list-style-type: none"> Pireno, benzo(a)pireno 	Principais carcinógenos das emissões de combustão
	Nitro-HPAs (≥ 3 anéis)	<ul style="list-style-type: none"> Nitropirenos 	Vários nitro-HPAs são mutagênicos e carcinogênicos potentes.

As PED, que representam a fração orgânica solúvel do MP, originam-se da exaustão do diesel e contêm numerosos compostos orgânicos adsorvidos em seu núcleo de carbono, os quais têm implicações ambientais enormes e incluem HPAs, hidrocarbonetos policíclicos nitroaromáticos (nitro-HPAs), heterocíclicos, quinonas, aldeídos e hidrocarbonetos alifáticos (9-11). Adicionalmente aos compostos orgânicos, traços de metais pesados como ferro, cobre, cromo e níquel também são adsorvidos no núcleo de carbono (12).

As PED são elementos importantes na constituição do material particulado com diâmetro aerodinâmico $< 2,5\mu\text{m}$ ($\text{MP}_{2,5}$) presente no ar ambiente de grandes centros urbanos (13). Praticamente todas as PED podem ser incluídas na faixa de tamanho do $\text{MP}_{2,5}$, apresentam diâmetros que variam entre 0,05 e 0,3 μm e possuem grandes áreas de superfície variando entre 30 e 100 m^2/g (14). Todas as partículas são inaláveis e podem ser agrupadas em duas classes químicas gerais: a) Fuligem – partículas de carbono elementar recobertas com compostos orgânicos e inorgânicos condensados e, b) Partículas ultrafinas (diâmetro aerodinâmico $< 0,1\ \mu\text{m}$) – partículas de material orgânico condensado e de compostos de enxofre com conteúdo mínimo ou ausente de carbono elementar (15). O número de partículas ultrafinas é dominante na distribuição número/tamanho em contraste com as partículas maiores que dominam a distribuição massa/tamanho. As partículas ultrafinas emitidas diretamente pelos motores a diesel são geradas pela condensação de emissões gasosas e rapidamente

passam por processos conhecidos como nucleação, coagulação e condensação, formando partículas maiores e tendo, portanto, uma meia-vida curta como partículas isoladas (5, 8).

A toxicidade das PED pode ser atribuída à própria partícula, aos componentes adsorvidos em sua superfície ou a ambos, e representa importante fonte de preocupação devido ao seu caráter universal de distribuição nas grandes cidades (16). Essas partículas podem causar a disfunção vascular (17), dano ao DNA (18), a oxidação dos tióis protéicos proximais (19) e induzir a proliferação celular (20), o estresse oxidativo (21, 22) e a apoptose (23, 24), efeitos associados às propriedades químicas dos compostos adsorvidos. A fração de partículas ultrafinas das PED pode contribuir diretamente para os efeitos sobre a saúde causados pelo MP ambiente devido às suas características físicas, pois seu componente sólido composto de partículas pouco solúveis é capaz de entrar tanto em células pulmonares epiteliais como macrófagos, ganhando acesso a alvos intracelulares (25), como no sistema circulatório, sendo posteriormente redistribuído para outros órgãos do corpo (26, 27). Seu componente não sólido, constituído em grande parte por compostos orgânicos, é solúvel em contato com as superfícies respiratórias, o que facilitaria sua distribuição e a expressão de sua toxicidade em tecidos extrapulmonares (15).

1.3 Partículas de Exaustão do Diesel e Saúde Reprodutiva

Devido à natureza universal de exposição ambiental em regiões metropolitanas e à grande diversidade de efeitos tóxicos comprometendo a saúde humana, vários estudos experimentais, epidemiológicos, toxicológicos e clínicos foram conduzidos nos últimos anos para avaliar o papel da exposição às PED na fisiopatologia de diferentes doenças. A exposição às PED liberadas no ar ambiente por motores a diesel foi ligada a doenças cardiorrespiratórias (28-30), distúrbios endócrinos (31, 32), alergia (33, 34) e câncer (35-37). Contudo, os estudos especificamente direcionados à toxicidade reprodutiva são focados em sua maioria no homem (38-41) ou no período gestacional (42-45), relegando ao segundo plano os aspectos femininos da saúde reprodutiva.

Em homens, os efeitos reprodutivos da exposição às PED incluem um aumento da concentração plasmática da testosterona, supressão da espermatogênese, evidenciada pela redução do número de espermátides alongadas nos túbulos seminíferos e da produção diária de espermatozóides, e uma maior incidência de espermatozóides com morfologia anormal (38, 41). De um modo geral todas essas alterações observadas podem contribuir para a redução da fertilidade masculina.

Em seu estudo, Yoshida et al. (38) submeteram camundongos à inalação de PED por 12 horas/dia durante um período de 6 meses e verificaram alterações ultra-estruturais das células de Leydig em concentrações de 0,3 mg de PED/m³ bem como redução da expressão do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) de receptores de LH dessas células em concentrações de 1,0 mg de PED/m³. Adicionalmente, observaram uma redução dose-dependente da produção diária de espermatozóides por grama de testículo de 29%, 36% e 53% para as concentrações de 0,3, 1,0 e 3,0 mg de PED/m³, respectivamente. A ausência de efeitos adversos evidentes foi observada para a concentração de 30 µg de PED/m³, um valor que se encontra abaixo do limite recomendado como seguro pela Organização Mundial da Saúde (OMS).

Recentemente, Izawa et al. (41) avaliaram a hipótese de que a toxicidade das PED sobre o sistema reprodutivo masculino poderia estar ligada aos HPAs presentes em sua superfície através da ligação aos receptores de aril-hidrocarbono (AhR). Uma vez que os HPAs são incorporados nas células, eles se ligam aos AhR para formar o complexo HPA-AhR, o qual é transferido para o núcleo e combinado ao translocador nuclear AhR. Esse complexo combina-se ao elemento de resposta à dioxina presente no DNA e expressa a família de genes do citocromo P450, tais como CYP1A1 e CYP1A2, envolvidos na carcinogênese, imunossupressão, teratogenicidade e toxicidade reprodutiva (41, 46-49). Os autores administraram concentrações crescentes de uma suspensão de PED (24,7,

74 e 220 µg/camundongo) por via subcutânea em machos de camundongo da linhagem Balb/c durante um período de cinco semanas e verificaram que a produção diária de espermatozóides e a sua viabilidade bem como a presença de espermátides alongadas nos túbulos seminíferos diminuíram significativamente nos grupos tratados com suspensões de PED nas concentrações de 74 e 220 µg/camundongo quando comparados ao grupo controle (administração do veículo apenas). Adicionalmente, a incidência de anormalidades espermáticas foi significativamente maior nesses grupos quando comparados aos grupos controle e tratados com a suspensão de PED na concentração de 24,7 µg/camundongo. Os níveis de testosterona e da atividade hepática do 7-etoxiresorufin-O-deetilase, utilizada como um índice indireto da atividade do AhR, no grupo tratado com a suspensão de PED na concentração de 74 µg/camundongo encontravam-se significativamente reduzidos quando comparados àqueles observados no grupo controle. Baseando-se nesses resultados, os autores concluíram que as PED claramente suprimem a função testicular, em particular a espermatogênese e motilidade espermática, de maneira dose-dependente e que tais efeitos podem estar relacionados ao AhR.

Os efeitos da exposição pré-natal às PED sobre a gestação, a prole e o desenvolvimento pós-natal têm sido avaliados através de estudos experimentais controlados. Evidências sugerem que a exposição materna às PED correlaciona-se com um aumento significativo da incidência de resultados adversos na gestação, incluindo as perdas fetais iniciais e

desenvolvimento perinatal inadequado (50). Os possíveis mecanismos através dos quais a exposição transplacentária às PED poderia afetar negativamente o resultado da gestação estariam associados ao aumento significativo da frequência de deleções do DNA no feto (43), a alterações da expressão de genes ligados ao sistema endócrino e imunológico no início e no final da gestação (42) e à atividade estrogênica dos nitrofenóis presentes nas PED (31). Essa exposição foi também associada a alterações da prole que incluem a redução do peso de nascimento, da distância ano-genital tanto em machos como em fêmeas, da diferenciação testicular e ovariana e do ganho de peso no período de lactação e a uma abertura vaginal mais precoce nas fêmeas (45, 50-52) e a alterações do seu sistema imunológico (53). Esses efeitos podem ser observados na prole mesmo nos casos nos quais a exposição às PED ocorreu durante o período pré-concepcional, indicando não haver necessidade de concomitância entre a exposição a essas partículas e o desenvolvimento fetal para que estes efeitos ocorram, provavelmente devido à liberação lenta das substâncias químicas adsorvidas na superfície dessas partículas que se encontram depositadas no pulmão materno (50).

Estudos realizados *in vivo* indicam que as PED possuem propriedades disruptoras sobre o sistema endócrino que podem afetar a diferenciação e função sexual (50, 51), aumentar o risco de abortamento (50) e desencadear a parturição de maneira anormal através do aumento da contratilidade uterina (31, 50). Essas observações mostram que as PED

contêm compostos que modulam a atividade estrogênica e são apoiadas por estudos *in vitro* que demonstram que tanto as partículas de diesel nativo, como aquelas que foram submetidas a sucessivas extrações com hexano, benzeno, diclorometano e metanol apresentam atividade estrogênica (54, 55). As substâncias químicas adsorvidas à superfície das PED que apresentam essa atividade estrogênica responsável por alterações do sistema endócrino incluem os nitrofenóis com estrutura alquil fenólica (3-metil-4-nitrofenol e 4-nitro-3-fenilfenol) e os 4,6- e 2,8-dimetildibenzotiofenos (31, 32, 56).

Adicionalmente, como vários eventos mediados por hormônios têm um papel importante no desenvolvimento e função do sistema nervoso central, é possível que a exposição aos disruptores endócrinos durante o desenvolvimento possa causar alterações cognitivas (57). A exposição às PED durante o período fetal influencia negativamente o tecido cerebral de camundongos, causando uma redução significativa no desempenho do teste de aprendizado de fuga passiva tanto em machos como em fêmeas e nos comportamentos ligados à emoção associados aos sistemas dopaminérgicos e serotoninérgicos (58). Por outro lado, Hougaard et al. (45) observaram que as proles de camundongos dos grupos controle e exposto às PED apresentaram desempenho similar nas tarefas de aprendizado e memória; as fêmeas da prole exposta apresentaram um aumento do desempenho da tarefa de aprendizado espacial reverso. Esses estudos

indicam que a exposição pré-natal às PED pode afetar de maneira diferencial os domínios responsáveis pela função cognitiva.

Contudo, apesar do caráter irrestrito da exposição às PED a qual os habitantes de áreas urbanas densamente desenvolvidas estão sujeitos e, em particular, da possibilidade de exposição intermitente a altas concentrações desse poluente de mulheres que estejam tentando engravidar de maneira natural ou assistida nestas regiões e de evidências indiretas que associam a exposição de fêmeas de camundongo às PED (42) e à poluição do ar ambiente (59, 60) ao resultado obstétrico desfavorável, refletido por uma diminuição significativa do número de fetos viáveis e aumento do número de falhas de implantação e de abortamentos, nenhum estudo foi realizado até o presente com o objetivo de avaliar os efeitos diretos dessa exposição sobre o desenvolvimento embrionário inicial que pudesse estar ligado ao resultado obstétrico adverso. Essas observações indicam a necessidade de novos estudos ligados especificamente a essa área do conhecimento para esclarecer questões que ainda permanecem obscuras.

1.4 Desafios

O processo reprodutivo representa um ciclo que envolve múltiplas etapas, que podem ser divididas de maneira geral em: período pré-concepcional, no qual os gametas masculinos e femininos adquirem a maturidade funcional necessária para que a fertilização ocorra; período de desenvolvimento embrionário pré-implantacional, no qual após divisões celulares sucessivas o zigoto atinge o estágio de blastocisto e adquire a capacidade de implantação no útero materno; período pré-natal, no qual durante a fase inicial da embriogênese a especificação das linhagens celulares germinativa e somática nas gônadas ocorre e, finalmente; período pós-natal que engloba a vida adulta, no qual a atividade hormonal se inicia na puberdade e o desenvolvimento e maturidade sexual ocorrem fechando esse ciclo.

Devido à complexidade desse processo, torna-se clara a necessidade da utilização de diferentes modelos experimentais para a avaliação dos diferentes eventos fisiológicos e moleculares envolvidos no mecanismo reprodutivo que ocorrem em cada uma dessas etapas. Recentemente, esses modelos foram propostos como bioensaios para a avaliação de efeitos potenciais dos contaminantes ambientais, persistentes ou não, sobre a fertilização e embriogênese inicial, uma vez que os principais obstáculos encontrados para a compreensão dos mecanismos anormais de

desenvolvimento decorrentes da embriotoxicidade incluem a limitação experimental, a escassez de material, e os numerosos fatores maternos, nutricionais e fisiológicos de confusão encontrados no útero (61).

A maioria dessas limitações pode hoje ser contornada através do estudo sistemático da fertilização e desenvolvimento embrionário inicial *in vitro*. Contudo, a análise dos eventos envolvidos no desenvolvimento embrionário inicial utilizando-se uma única abordagem, apesar de fornecer informações importantes sobre uma etapa específica da embriogênese, será incapaz de fornecer uma visão completa de qualquer mecanismo que esteja envolvido na toxicidade reprodutiva; uma vez que é muito pouco provável que um mecanismo universal único seja encontrado para explicar as manifestações tóxicas para o embrião causadas por variações extremas das condições ambientais decorrentes da exposição a substâncias químicas. De fato, a elucidação de diferentes mecanismos de toxicidade do desenvolvimento ocorrerá somente após a combinação sistemática de vários modelos *in vivo* e *in vitro* que empregam diferentes níveis de organização biológica e de complexidade (61).

Várias manifestações da toxicidade embrionária decorrente da exposição aos poluentes ambientais expressam-se de maneira distinta durante as diversas fases do desenvolvimento devido à natureza dinâmica e interativa desse processo e à janela de sensibilidade específica que depende não somente do tecido, mas também da espécie. De um modo

geral, exposições maternas idênticas a um determinado agente poluente em momentos diferentes da gestação podem produzir uma gama de efeitos deletérios característicos de processos específicos do desenvolvimento que eram particularmente suscetíveis no momento da exposição, que variam de alterações embrionárias grosseiras a alterações seletivas em níveis moleculares e celulares, enfatizando a necessidade da utilização de modelos específicos para o estudo dessas alterações.

O sistema murino de FIV e de cultivo embrionário têm sido utilizado por muitos anos como um modelo para o estudo da FIV humana, devido à sua relevância para a compreensão do mecanismo reprodutivo pré-implantacional, e como ferramenta para o controle de qualidade de materiais, de condições de cultura, de equipamentos e treinamento de novas técnicas desenvolvidas, podendo ainda ser utilizado para a identificação dos possíveis efeitos de diferentes poluentes ambientais atuando isoladamente ou em combinação sobre o desenvolvimento embrionário inicial.

Condições ideais de fertilização e cultura embrionária *in vitro* dependem de vários parâmetros, porém as características genéticas das diferentes linhagens de camundongo e a composição dos meios de cultura utilizados representam os fatores mais importantes para o sucesso da interação entre os gametas e o desenvolvimento embrionário subsequente (62, 63). Portanto, para a obtenção de resultados adequados e consistentes nesses modelos, a definição da linhagem, particularmente no caso de

linhagens isogênicas nas quais os animais usualmente respondem de maneira pobre à estimulação ovariana, e a escolha do sistema de cultivo embrionário, primariamente dependente da composição do meio de cultura e de sua suplementação com proteínas exógenas, da concentração de CO₂ e de O₂, da estabilidade das condições de incubação (volume e densidade embrionária) são de fundamental importância.

Embora diferentes tipos de meios de cultura possibilitem a FIV no modelo de camundongo, vários não suportam o desenvolvimento dos zigotos além do estágio de duas células, uma vez que a concentração relativamente alta de glicose desses meios, necessária para a manutenção da motilidade espermática, inibe o desenvolvimento inicial dos embriões de camundongo (64, 65). Esse fenômeno, referido como “bloqueio de duas células”, depende primariamente da linhagem do animal que forneceu os oócitos e não dos espermatozoides (66). Esse bloqueio pode ser evitado através da adição do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ao meio de cultura. Contudo, o seu efeito benéfico sobre o desenvolvimento embrionário *in vitro* está restrito ao embrião que já sofreu a sua primeira clivagem (67).

A introdução de um meio simples otimizado enriquecido com potássio (KSOM) suplementado com EDTA (0,01 mmol/L) permitiu contornar o “bloqueio de duas células” em diferentes linhagens de camundongos, possibilitando o desenvolvimento de zigotos até o estágio de blastocisto em um sistema de cultura conhecido como cultura em etapa única (68).

Posteriormente, a adição de aminoácidos essenciais e não essenciais ao meio KSOM melhorou ainda mais o desenvolvimento embrionário *in vitro* de diferentes linhagens de camundongos através do aumento das taxas de formação e de eclosão, bem como, do número total de células dos blastocistos (69, 70). Recentemente, uma nova geração de meios de cultura embrionária seqüencial, formulada com diferentes concentrações de carboidratos e de aminoácidos, foi desenvolvida levando-se em conta as mudanças fisiológicas e necessidades metabólicas do embrião através do seu desenvolvimento a partir do zigoto até o blastocisto (sistema de cultivo de duas etapas) (71). O meio seqüencial G1/G2 desenvolvido para a cultura de embriões humanos tem sido utilizado com sucesso para a cultura de embriões de camundongo até o estágio de blastocisto (72, 73).

Contudo, a preparação dos meios de cultura no laboratório de pesquisa é uma tarefa cara, pois consome muito tempo, tanto do pessoal envolvido como da utilização dos equipamentos do laboratório para essa tarefa e necessita de um bioensaio para o controle de qualidade de cada novo lote preparado. Por esse motivo, a utilização de um meio de cultura comercial, pré-testado e de elevado padrão de qualidade representa uma alternativa atraente, permitindo que o pesquisador concentre seus esforços em seu experimento e não no preparo do meio de cultura.

Desse modo, o primeiro desafio identificado em minha linha de pesquisa foi justamente o estabelecimento de um modelo animal de FIV que

fosse confiável em termos de reproducibilidade, uma vez que vários projetos utilizariam esse modelo, e que não interferisse nos resultados dos experimentos, dificultando, assim, sua interpretação apropriada, pois não havia nenhum modelo de FIV animal já sendo utilizado em nosso laboratório por outros pesquisadores. Como alguns dos projetos tinham como princípio a utilização de um protocolo de exposição à poluição ambiental caracterizado pela reprodução das condições encontradas em um grande centro urbano, sendo impossível a sua duplicação uma vez que estes seriam realizados no período do ano no qual os poluentes atingem seu nível máximo no ar ambiente, esse modelo deveria ser consistente em termos de resultados obtidos.

O projeto piloto realizado no primeiro semestre de 2006 possibilitou a identificação antecipada das dificuldades que seriam enfrentadas nos projetos originais. Neste projeto avaliou-se a resposta ovariana de diferentes linhagens de camundongos à estimulação com gonadotrofinas, as doses de gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) e de gonadotrofina coriônica humana (hCG) utilizadas para a estimulação e desencadeamento da ovulação, respectivamente, e o potencial de fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro*, em diferentes meios e condições de cultura. Como esperado, identificamos uma pior resposta à estimulação ovariana das linhagens isogênicas (Balb/c e C57BL) em comparação à linhagem Swiss Albino, na qual os animais apresentam uma variabilidade genética similar à observada na espécie humana (62). A seleção da linhagem Swiss Albino foi

determinada justamente pelas características apresentadas anteriormente, ou seja, a melhor resposta à estimulação ovariana, o que reduziria o número de animais utilizados nos experimentos, reduzindo custos e possibilitando a exposição simultânea de todos os animais às condições determinadas nos protocolos dos diferentes experimentos e a variabilidade genética da linhagem, o que permitiria avaliar os efeitos dos protocolos de exposição nos diferentes padrões de resposta à estimulação ovariana.

Após a definição das doses consideradas como ideais para a estimulação e desencadeamento da ovulação nas fêmeas da linhagem selecionada para os projetos, utilizamos diferentes meios de cultura comerciais, condições de incubação e protocolos de checagem do desenvolvimento e qualidade embrionária *in vitro*, para definir qual seria o melhor sistema de cultura para os embriões. A diferença dos resultados preliminares observados com a utilização dos meios de cultura comercialmente disponíveis (KSOM, Specialty Media, Chemicon, Phillipsburg, NJ, EUA e; G1/G2, Vitrolife AB, Gothenburg, Suécia) com relação às taxas de formação e de eclosão dos blastocistos produzidos através da FIV levou-me à elaboração do protocolo do primeiro projeto da minha linha de pesquisa para definir qual seria o melhor meio para a cultura dos embriões de camundongo. O principal desafio deste projeto foi minimizar o efeito individual das fêmeas sobre os resultados do experimento, o que poderia levar a conclusões errôneas. Para solucionar esse problema, considerou-se como unidade experimental cada grupo de dez zigotos. As

unidades experimentais das fêmeas de camundongo foram distribuídas de maneira aleatória em gotas dos meios KSOM e G1/G2 para o cultivo até o estágio de blastocisto. A eliminação do efeito individual que cada fêmea poderia exercer sobre o resultado final, devido à sua variabilidade genética, foi obtida através da seleção aleatória de três unidades experimentais de cada fêmea para a avaliação do potencial de desenvolvimento dos oócitos nas duas condições cultura.

Com relação ao segundo projeto, o principal desafio encontrado foi determinar qual a melhor técnica para a administração das PED, uma vez que na época o laboratório ainda não possuía o concentrador de partículas, um equipamento capaz de reproduzir em condições controladas os efeitos da inalação das PED em animais de laboratório (74). A instilação intranasal diária nos camundongos do experimento de uma suspensão de PED dissolvidas em água destilada estéril na concentração de 5 mg/mL foi a solução encontrada para resolver esse desafio. Essa técnica é adequada para os estudos de toxicidade, pois possibilita a deposição das partículas de maneira uniforme no interior dos pulmões devido ao reflexo de apnéia seguido de inspiração profunda que causa, mimetizando o processo de inalação das partículas presentes no ar ambiente (75).

Os pontos de avaliação selecionados neste projeto para determinar os efeitos da exposição de curta duração às PED sobre a fertilização e o desenvolvimento embrionário *in vitro* (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 sobre a qualidade (contagem diferencial e razão das duas primeiras linhagens celulares dos blastocistos e morfologia da massa celular interna, MCI) desses embriões permitiu o acompanhamento detalhado de várias etapas do desenvolvimento pré-implantacional, até então não avaliadas nos estudos de exposição à PED. Como o potencial de desenvolvimento do coorte de blastocistos de cada fêmea do experimento poderia representar um fator de confusão na avaliação do grau de evolução da eclosão e desenvolvimento desses blastocistos nas avaliações realizadas 96 e 120 horas após o início do cultivo dos zigotos, 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 observados nas avaliações citadas acima e, posteriormente, um escore discriminatório, desenvolvido através de um modelo matemático, cujo objetivo era justamente equilibrar o padrão de eclosão e o potencial de desenvolvimento destes blastocistos, permitindo a identificação de fêmeas com coortes de blastocistos que apresentavam padrões similares de eclosão mas potenciais distintos de desenvolvimento.

Para uma análise mais adequada da qualidade embrionária no estágio de blastocisto, além de determinar o número e a razão das células de cada uma das duas primeiras linhagens do blastocisto, MCI e trofoectoderma (TE), o sistema de avaliação da morfologia da MCI

desenvolvido por Gardner e Schoolcraft (76) foi modificado para atender às necessidades deste projeto. A distribuição espacial dos núcleos celulares da MCI foi classificada de acordo com o grau de integridade morfológica dessa estrutura (escore MCI), permitindo comparar de maneira objetiva os blastocistos dos diferentes grupos de exposição.

Estudos experimentais conduzidos em nosso laboratório demonstraram que a exposição crônica à poluição ambiental particulada estava associada a um aumento do número de falhas de implantação, à redução do número de fetos viáveis e a taxas maiores de abortamento (59, 60). Essas observações associadas aos resultados obtidos no segundo projeto da minha linha de pesquisa, no qual se verificou que a exposição de curta duração às PED afetava de maneira significativa a qualidade embrionária sem afetar o seu desenvolvimento *in vitro*, resultaram na elaboração do último projeto dessa linha, um estudo epidemiológico focado nos efeitos da exposição de curta duração às PED sobre os resultados laboratoriais e clínicos de casais inférteis submetidos à FIVETE, que tinha como objetivo principal investigar se as alterações reprodutivas identificadas nos estudos experimentais controlados poderiam ser transpostas para a arena clínica, pois esse tipo de estudo é capaz de fornecer evidências empíricas importantes sobre aumento do risco para a saúde resultante da exposição à poluição ambiental (77).

Questões metodológicas e estatísticas representaram os principais desafios encontrados neste projeto, que procurou ligar o risco (exposição à poluição ambiental particulada) ao efeito (sucesso dos ciclos de FIVETE) utilizando o conjunto de dados (resultados clínicos e laboratoriais dos ciclos de FIVETE) para outro propósito do que aquele para o qual ele foi coletado. O estudo de coorte retrospectivo foi utilizado na primeira fase do estudo, no qual os efeitos potenciais da exposição de curta duração à poluição ambiental particulada durante a fase folicular sobre os resultados clínicos e laboratoriais dos ciclos de FIVETE de casais inférteis foram avaliados. Para a segunda fase, empregou-se o modelo caso-controle para explorar o impacto dessa exposição sobre resultado obstétrico das pacientes inférteis que obtiveram a gestação através do tratamento, utilizando mulheres que conceberam naturalmente durante o mesmo período temporal como grupo controle casado.

Considerando-se que, entre os diferentes poluentes que constituem a poluição ambiental, as associações mais significativas e consistentes com relação aos efeitos sobre a saúde humana foram encontradas para o MP, que o efeito negativo que a exposição aguda às PED ou a exposição crônica ao MP_{2,5} exercem sobre a qualidade embrionária, e que o fato de que a concentração MP₁₀ foi determinada diariamente em todas as estações de controle ambiental da cidade de São Paulo durante todo o período do estudo (janeiro de 1997 a dezembro de 2006), o MP₁₀ foi selecionado para a avaliação dos efeitos da poluição ambiental sobre o resultado dos ciclos

FIVETE utilizados no tratamento de casais inférteis. Essa seleção de um único poluente a partir de uma mistura complexa de compostos presentes na poluição ambiental poderia representar um viés importante na análise dos resultados, pois alguns dos efeitos observados poderiam ser atribuídos a outros poluentes. Contudo, estudos epidemiológicos que avaliaram o papel dos poluentes gasosos como fatores de confusão para os efeitos do MP, em particular o MP_{2,5}, sobre a saúde mostraram que a utilização de modelos que incluem múltiplos poluentes não seria apropriada e que esses efeitos poderiam ser de fato atribuídos ao MP ambiente, um substituto da exposição pessoal (78-80), justificando então a escolha do MP₁₀ como poluente único para avaliação.

A partir da definição do poluente de interesse, outro desafio enfrentado foi justamente a definição da forma de tratamento que seria atribuída aos dados do poluente. Neste projeto, o MP₁₀ foi tratado tanto como variável contínua como categórica. A média mensal de suas concentrações foi calculada para todo o período do estudo (1997-2006), utilizando-se os dados históricos coletados nesse intervalo pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) do estado de São Paulo e um gráfico foi construído relacionando as concentrações médias do MP₁₀ e os meses do ano, a fim de identificar um padrão de sazonalidade das variações dessas concentrações. O MP₁₀ foi categorizado em quartis (Q₁: ≤ 30,48 µg/m³, Q₂: 30,49-42,00 µg/m³, Q₃: 42,01-56,72 µg/m³ e, Q₄: > 56,72 µg/m³); o risco de exposição foi dividido em dois períodos, de acordo com os

meses do ano nos quais as concentrações e intervalos de confiança para esse poluente estivessem no quartil superior (período Q₄) ou não (período Q₁₋₃) e que excedessem a média anual de 50 µg/m³ definida pela CETESB como limite padrão de qualidade do ar para a saúde (81). O período Q₄ coincidiu com os meses de inverno (junho a agosto) no Brasil.

Os fatores de confusão para a interpretação dos dados resultantes dos efeitos da exposição à poluição particulada sobre os resultados clínicos e laboratoriais dos ciclos de FIVETE foram tratados ou definidos de acordo com suas particularidades. A idade das pacientes, um fator importante que afeta de maneira significativa os resultados dos ciclos de FIVETE (82), foi tratada como variável independente e categorizada em duas faixas etárias (< 35 e ≥ 35 anos). O padrão de resposta ovariana à estimulação com gonadotrofinas, outro fator que afeta diretamente esses resultados (83), foi identificado através da análise de agrupamento de k-médias, considerando-se os números de oócitos recuperados e inseminados e categorizado como pobre (centróides: 5,2±2,6 e 3,8±1,9; respectivamente), normal (centróides: 12,2±2,7 e 9,4±2,3, respectivamente) ou elevado (centróides: 22,5±4,3 e 17,1±3,9, respectivamente) e também tratado como variável independente. Para eliminar a possibilidade de que uma paciente previamente submetida à FIVETE sem sucesso pudesse introduzir um fator adicional de confusão na interpretação dos dados, apenas os ciclos de casais que eram submetidos pela primeira vez a esta forma de tratamento foram selecionados para a análise. Da mesma forma, o grupo controle utilizado na segunda fase do

estudo incluiu apenas mulheres que conceberam naturalmente pela primeira vez no período do estudo.

2. OBJETIVOS

Os objetivos da linha de pesquisa desenvolvida para avaliar os efeitos da exposição pré-concepcional de curta duração ao material particulado ambiental sobre o mecanismo reprodutivo feminino, incluindo o projeto de desenvolvimento do modelo animal, o estudo experimental e o estudo epidemiológico são apresentados abaixo de acordo com o seu respectivo projeto:

2.1. Projeto Modelo Animal

Título do Projeto: Comparação da eficácia de dois meios comercialmente disponíveis para a cultura de zigotos no modelo de fertilização *in vitro* em camundongos.

Objetivo: comparar o desenvolvimento de oócitos de fêmeas de camundongo fertilizados *in vitro* até o estágio de blastocisto, utilizando dois meios de cultura comerciais (KSOM e G1/G2) que se baseiam diferentes conceitos sobre as necessidades fisiológicas e metabólicas de embriões de camundongo.

2.2. Projeto Instilação Nasal

Título do Projeto: Efeitos da exposição de curta duração de fêmeas de camundongo às partículas de exaustão do diesel sobre a fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro*.

Objetivo: avaliar os possíveis efeitos da exposição de curta duração às partículas de exaustão do diesel sobre a fertilização, desenvolvimento embrionário e segregação das duas primeiras linhagens celulares em blastocistos pré-implantacionais utilizando o modelo de fertilização *in vitro* em camundongos.

2.3. Projeto Poluição Ambiental Particulada e FIVETE

Título do Projeto: Efeitos da exposição a altas concentrações de poluição ambiental particulada durante a fase folicular sobre o resultado do tratamento de casais inférteis submetidos à fertilização *in vitro* e transferência de embriões (FIVETE).

Objetivo: avaliar os possíveis efeitos da exposição de curta duração à poluição ambiental particulada durante a fase folicular sobre os resultados clínicos e laboratoriais de mulheres submetidas ao seu primeiro ciclo de FIVETE. Adicionalmente, o estudo também foi desenhado para explorar o impacto dessa exposição no resultado da gestação de pacientes inférteis, avaliando o possível papel da FIVETE sobre esse resultado, tendo como grupo controle casado mulheres que conceberam naturalmente durante o mesmo período.

3. MÉTODOS

Dentro desta linha de pesquisa, as metodologias específicas de cada um dos projetos desenvolvidos: 1) Modelo Animal; 2) Instilação Nasal e; 3) Poluição Ambiental Particulada e FIVETE; 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 pré-concepcional de curta duração ao material particulado ambiental sobre o mecanismo reprodutivo feminino são apresentados abaixo:

4.1. Projeto Modelo Animal

Nenhum estudo comparando-se os efeitos de diferentes meios de cultura comercialmente disponíveis sobre o desenvolvimento de zigotos de camundongo produzidos através de FIV até o estágio de blastocisto foi realizado até o presente. O propósito deste estudo foi comparar o desempenho de duas linhas de meios de cultura comerciais (KSOM e G1/G2), que se baseiam em conceitos diferentes das necessidades fisiológicas e metabólicas dos embriões, para o cultivo de oócitos de fêmeas de camundongo até o estágio de blastocisto, avaliando as taxas de formação e de eclosão dos blastocistos, o seu número total de células e a proporção de alocação das células MCI e TE.

Os resultados desse estudo demonstram que o meio comercial KSOM é claramente superior ao meio seqüencial G1/G2 em relação à capacidade de possibilitar o desenvolvimento de zigotos produzidos através de FIV até o estágio de blastocisto (> 90%) no modelo de fertilização *in vitro* em camundongos. A comparação dos dois protocolos de cultura embrionária mostra que o meio KSOM melhora não somente a capacidade de desenvolvimento dos zigotos até o estágio de blastocisto, fornecendo porcentagens significativamente maiores de blastocistos 96 e 120 horas após a inseminação e favorecendo o processo de eclosão no quinto dia de cultura, mas também a qualidade dos blastocistos, pois a MCI de

blastocistos derivados da cultura de zigotos em meio KSOM continha um número significativamente maior de células quando comparada àquela de blastocistos derivados da cultura em meio G1/G2.

Esses resultados são fortemente favoráveis à seleção do meio KSOM como primeira escolha para o protocolo de cultura de embriões no modelo de FIV em camundongos, pois esse meio propicia um melhor ambiente de cultura para o desenvolvimento embrionário *in vitro* e diferenciação celular do blastocisto do que aquele oferecido pelo meio seqüencial G1/G2.

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

4.2. Projeto Instilação Nasal

Apesar da natureza universal de exposição às PED em grandes áreas urbanas e da possibilidade de que mulheres que vivem nessas regiões sejam expostas a altas concentrações de poluentes por um período limitado de tempo e que estão tentando engravidar de maneira natural ou assistida, os efeitos diretos dessa exposição sobre o desenvolvimento embrionário inicial e sua ligação ao resultado obstétrico adverso não são encontrados na literatura médica. Nesse estudo foram avaliados os possíveis efeitos da exposição de curta duração às PED sobre a fertilização, o desenvolvimento embrionário e a segregação celular em blastocistos pré-implantacionais, utilizando-se o modelo de FIV em camundongos.

O achado mais relevante desse estudo mostra que a exposição de curta duração às PED pode afetar o desenvolvimento embrionário de maneira específica, através de um distúrbio do padrão de segregação normal das duas primeiras linhagens celulares do blastocisto, tanto devido à redução do número de células como por perda da integridade morfológica da MCI. A observação de que o número total de células do blastocisto permaneceu inalterado a despeito da exposição às PED indica para o fato de que o mecanismo envolvido no processo de segregação celular foi desviado para a linhagem de células TE.

Adicionalmente, a redução do número de células da MCI e a perda de sua integridade morfológica ocorreram de maneira similar nos embriões de fêmeas expostas tanto às partículas de exaustão do diesel nativo (PED-N) como às do diesel ácido-extraído (PED-AE), indicando que o efeito negativo ainda permanecia presente mesmo após alterações significativas da composição de compostos orgânicos e de metais pesados observadas após o processo de extração ácida. A resposta variável dos ovários às gonadotrofinas, devido à variabilidade genética da linhagem de camundongo selecionada, não afetou a especificação celular nos blastocistos e não alterou a susceptibilidade dos diferentes subgrupos aos efeitos da exposição às PED-N ou PED-AE com relação a esse parâmetro, embora tenha apresentado um impacto negativo na fertilização, evidenciado através da redução significativa do número de zigotos observada no grupo de resposta elevada quando comparado aos subgrupos de resposta normal ou pobre.

As tabelas e detalhes dos resultados desse estudo são encontrados no Anexo B.

4.3. Projeto Poluição Ambiental Particulada e FIVETE

A exposição aos poluentes ambientais pode ser inevitável durante o período pré-concepcional e seus efeitos são desconhecidos. Neste estudo, dividido em duas fases, avaliou-se o possível papel da exposição de curta duração à poluição ambiental particulada durante a fase folicular sobre os resultados clínicos, laboratoriais e da gestação de casais submetidos à FIVETE.

Na primeira fase, os efeitos da exposição pré-concepcional de curta duração ao MP_{10} em uma situação observada na vida real sobre os resultados clínicos e laboratoriais de casais submetidos à FIVETE foram avaliados. Na segunda, uma análise caso-controle das pacientes que engravidaram através do tratamento foi realizada para avaliar o impacto desta exposição sobre o resultado da gestação, avaliando o possível papel da FIVETE sobre esse resultado e utilizando mulheres que conceberam naturalmente pela primeira vez durante o mesmo período do estudo como grupo controle casado.

Os resultados observados fornecem evidências de que a exposição pré-concepcional de curta duração a altas concentrações de MP_{10} ambiental, de mulheres submetidas à FIVETE que habitam em um grande centro urbano, não afeta a resposta ovariana, os resultados clínicos e laboratoriais

ou o sucesso do tratamento, refletido por taxas similares de gestação e de implantação embrionária. Contudo, observou-se que a exposição transitória a níveis de MP_{10} discretamente acima do limite superior do padrão de qualidade do ar determinado pela média deslizando de 24 horas ($50 \mu\text{g}/\text{m}^3$) durante a fase folicular está associada a um aumento do risco de perda da gestação inicial, tanto em mulheres férteis como inférteis. Esse risco foi 2,6 vezes maior para as pacientes que conceberam, naturalmente ou não, durante o inverno (junho a agosto), quando comparado ao risco de pacientes que conceberam fora desse período. Adicionalmente, observou-se que a FIVETE foi incapaz de reduzir esse risco, apesar da seleção cuidadosa dos embriões e do número de embriões transferidos ao útero materno ser maior do que aquele que ocorre em um ciclo de concepção natural, fatores que poderiam refletir o potencial benéfico do ciclo de tratamento.

As tabelas e detalhes dos resultados deste estudo são encontrados no Anexo C.

5. DISCUSSÃO

Na espécie humana, o sucesso ou falha do processo reprodutivo traduz um equilíbrio delicado de numerosos fatores, tais como idade, comportamento social, hereditariedade, ambiente hormonal e nutricional, permeabilidade do trato reprodutivo, produção e reserva de gametas, desenvolvimento e qualidade embrionária e receptividade uterina atuando em conjunto. O período pré-implantacional de desenvolvimento representa um momento crítico durante o qual o embrião é altamente susceptível a insultos exógenos que podem afetar o seu potencial futuro de desenvolvimento e crescimento, tanto durante a fase pré como pós-natal (84). Alterações do potencial de desenvolvimento podem surgir da inevitável exposição materna aos poluentes ambientais durante o período periconcepcional, afetando não somente o resultado reprodutivo, mas também o resultado gestacional e/ou o desenvolvimento pós-natal (85).

A introdução da técnica de fertilização e cultura embrionária *in vitro* na prática clínica abriu uma janela fundamental para a observação de eventos únicos do mecanismo reprodutivo que ocorrem no período anterior à implantação. A possibilidade de monitorar de perto os diferentes aspectos da interação dos gametas e do desenvolvimento embrionário inicial com relação à divisão celular, morfologia e qualidade (regularidade, simetria, fragmentação, multinucleação) embrionária possibilitaram que a FIV tanto

humana como animal pudesse ser utilizada como um modelo relevante para a avaliação dos efeitos pré-implantacionais da exposição aguda ou crônica à poluição ambiental sobre a reprodução.

O conhecimento científico sobre a relação entre o ambiente e a saúde humana avançou rapidamente na última década e tem mostrado que grande parte dos problemas de saúde, incluindo a infertilidade, é causada ou influenciada pela exposição aos poluentes ambientais. O principal desafio encontrado nesta área do conhecimento hoje resulta da complexa interação entre o padrão de exposição ao poluente ambiental e o desenvolvimento e evolução da doença. A compreensão dessa interação é necessária para uma melhor avaliação dos riscos, identificando a susceptibilidade temporal (período pré-concepcional, pré-implantacional, pré-natal, pós-natal), espacial (localização geográfica) e individual (comorbidade, estado nutricional, nível socioeconômico), para a validação dos estudos epidemiológicos, para a identificação da interação genética e ambiental e, para transpor o acúmulo de conhecimento adquirido sobre a exposição para a arena clínica, pois, além da toxicidade de uma determinada substância, fatores tais como o padrão e duração da exposição, o polimorfismo genético e a idade do indivíduo determinam se essa exposição resultará no aparecimento da doença.

A exposição aos poluentes ambientais durante os diferentes estágios da vida (períodos pré e periconcepcional, fetal, perinatal e peripuberal e vida

adulto) pode ter impactos distintos sobre a saúde reprodutiva, pois o processo contínuo de desenvolvimento cria janelas de vulnerabilidade para efeitos específicos. Desse modo, o resultado da exposição aos contaminantes ambientais em cada uma dessas janelas de vulnerabilidade pode se manifestar através de escalas temporais completamente distintas, algumas delas envolvendo longos períodos de latência. Um único poluente pode afetar vários tecidos através da alteração da expressão de vários genes, um efeito que varia de acordo com o nível e o momento da exposição, ativando vias de sinalização distintas. Por outro lado, diferentes poluentes podem determinar a mesma alteração fisiológica através da atuação sobre uma única via de sinalização. Finalmente, os efeitos da exposição a um único poluente são diferentes e muitas vezes subestimados quando comparados aos efeitos desse poluente presente em uma mistura. Todos esses distúrbios podem envolver alterações morfológicas e/ou funcionais, ou mesmo, aumento da sensibilidade a exposições endógenas ou exógenas subsequentes (86).

Estudos experimentais recentes desenvolvidos em nosso laboratório demonstraram que efeitos adversos sobre aspectos específicos do mecanismo reprodutivo podem ser verificados mesmo após a exposição a níveis relativamente baixos de contaminantes atmosféricos derivados das emissões do tráfego presentes no ar ambiente de centros urbanos, níveis estes que se encontram dentro de faixas consideradas como seguras pelos órgãos responsáveis pelo controle e monitoramento da qualidade ambiental

(59, 87). Contudo, um número limitado de estudos experimentais e epidemiológicos realizados até o presente fornece dados relevantes para a identificação de uma possível associação entre a exposição a níveis relativamente baixos de poluentes ambientais e a saúde reprodutiva (59, 87-90), e poucos estudos foram capazes de demonstrar uma associação entre a poluição do ar ambiente e o comprometimento da fertilidade feminina, provavelmente devido à multiplicidade de fatores envolvidos na função reprodutiva feminina (91, 92). Finalmente, pouco se sabe sobre o impacto da exposição pré-concepcional ao ar ambiente de uma região metropolitana sobre o desenvolvimento embrionário inicial (59, 60).

A falta de estudos específicos de possíveis efeitos da exposição pré-concepcional de curta duração à poluição ambiental particulada, tanto em animais como em humanos, associada ao projeto temático “Poluição atmosférica na região metropolitana de São Paulo: impacto sobre a saúde da população e proposta de medidas saneadoras” desenvolvido 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, com o objetivo de estimular pesquisas interdisciplinares dos efeitos da poluição ambiental sobre os diferentes sistemas do organismo e de integrar as visões dos cientistas àquelas dos responsáveis pela política ambiental, favoreceram a incorporação da minha linha de pesquisa, direcionada à avaliação dos

efeitos da poluição ambiental particulada sobre o desenvolvimento embrionário inicial e resultado obstétrico, como parte deste projeto temático. Contudo, para a viabilização da minha linha de pesquisa que seria paralela à da Dra. Mariangela Maluf, referente aos efeitos da exposição crônica pré-concepcional sobre a fertilização e desenvolvimento embrionário inicial nos extremos da vida reprodutiva, era necessário o desenvolvimento de um modelo animal que permitisse o estudo do embrião em sua fase inicial de desenvolvimento.

Os resultados do projeto de desenvolvimento de um modelo de FIV em camundongos utilizando duas linhas distintas de meios de cultura comerciais (KSOM e G1/G2) demonstraram claramente que o meio KSOM é superior ao meio seqüencial G1/G2 com relação à capacidade de desenvolvimento dos zigotos até o estágio de blastocistos e à qualidade desses blastocistos, uma vez que a MCI de blastocistos derivados da cultura de zigotos em meio KSOM apresentou um número significativamente maior de células quando comparada àquela dos blastocistos derivados da cultura no meio G1/G2. As elevadas taxas de formação de blastocistos após a cultura no meio KSOM tanto 96 (84%) como 120 horas (94%) após a inseminação dos oócitos observada neste estudo é consistente com publicações anteriores de outros grupos que mostraram taxas variando entre 72% e 88% para o período de 96 horas (93, 94) e entre 83% e 88% para o período de 120 horas (73, 95) de cultivo.

De modo similar, o processo de eclosão dos blastocistos que se desenvolveram no meio de cultura KSOM foi similar àquele reportado por Biggers et al. (73), que observou que a maioria dos blastocistos (~98%) havia ao menos iniciado esse processo após 120 horas de cultura nesse meio. Apesar de importantes diferenças metodológicas observadas quando esse estudo é comparado ao de Biggers et al. (73), tais como linhagem das fêmeas de camundongo, a fertilização *in vitro* dos oócitos e a nova formulação do meio de cultura seqüencial, nossos dados confirmam a tendência apresentada por esses pesquisadores de que protocolos utilizando um meio único podem ser utilizados com sucesso para a cultura de zigotos, produzidos *in vivo* ou *in vitro*, até o estágio de blastocisto no modelo de camundongo. Em contraste aos dados publicados anteriormente sobre a utilização do meio de cultura seqüencial (73, 96, 97), observamos que os embriões cultivados no meio G1/G2 apresentavam não somente taxas significativamente menores de formação de blastocistos, tanto 96 como 120 horas após a inseminação (~55% e ~77%, respectivamente), mas também uma proporção menor de blastocistos que apresentaram eclosão parcial ou completa nesse protocolo de cultura (~84%).

A contagem do número de células das duas primeiras linhagens celulares e o cálculo de sua razão (MCI/TE) no blastocisto fornecem informações específicas sobre o seu potencial de desenvolvimento e de implantação que são importantes para o sucesso obstétrico e desenvolvimento de um feto normal (98, 99). Neste estudo, a comparação

das duas populações celulares distintas (células da MCI e TE) presentes nos blastocistos mostrou que aqueles que se desenvolveram no meio KSOM apresentavam um número significativamente maior de células MCI do que aqueles que se desenvolveram no meio G1/G2. Os números médios de células MCI e TE (11,7 e 36,4, respectivamente) dos blastocistos que se formaram após o cultivo de zigotos por 96 horas no meio KSOM observados neste estudo estão em acordo com aqueles observados por Erbach et al. (93) (10,0 e 34,2, respectivamente), que compararam o desenvolvimento de embriões de camundongo em cinco meios de cultura diferentes, incluindo o meio otimizado simples (SOM) e o KSOM.

Os dados apresentados nesse estudo mostraram que o uso de um meio de cultura único (KSOM) mostrou-se como a estratégia mais apropriada no modelo de FIV em camundongo para contribuir com o desenvolvimento embrionário adequado. Em razão do desenho do estudo, no qual todas as outras variáveis que pudessem ter um impacto no resultado do FIV exceto o meio de cultura foram controladas, esses achados apresentados acima apóiam a visão de alguns cientistas para os quais o uso de um meio de cultura seqüencial não é necessário para a obtenção de um desenvolvimento embrionário pré-implantacional adequado (73, 95, 100), embora outros advoguem o uso do protocolo de cultivo em meios seqüenciais como fundamental para o desenvolvimento de blastocistos altamente viáveis (101, 102).

A utilização de meios de cultura comercialmente disponíveis para a FIV animal evita as potenciais desvantagens do preparo desses meios no laboratório de pesquisa relacionadas ao trabalho e tempo gasto no seu preparo e ao custo envolvido no controle de qualidade e variação lote a lote, embora essa variação possa também ocorrer em meios comerciais (64). Adicionalmente, a observação de que zigotos de camundongo podem ser cultivados com sucesso até o estágio de blastocisto em um único meio de cultura indica como principais vantagens de sua utilização sobre os meios seqüenciais a redução da carga de trabalho devido à menor manipulação dos embriões, a redução do consumo de materiais e de meio de cultura, o uso racional dos equipamentos e a simplificação do processo de controle de qualidade. De maneira geral, o custo envolvido em projetos que utilizam esse modelo animal é reduzido de maneira significativa.

Baseando-se nesses achados, pode-se especular que os resultados distintos observados na comparação dos meios KSOM e G1/G2 poderiam estar relacionados ao próprio embrião ou às condições de manipulação ou transporte às quais esses meios estão sujeitos. Wang et al. (103) analisaram a expressão das proteínas quinase ativadas por mitógeno p38 (MAPKs) e das fosfoproteínas quinase (Jun) ativadas por estresse (SAPK/JNK), mediadores da transdução do sinal da superfície ao núcleo celular em resposta ao estresse, às condições não ideais de cultura de embriões de camundongo e a sua correlação com o desenvolvimento pré-implantacional. Esses autores observaram que a fosforilação do MAPK e SAPK/JNK foram

significativamente diferentes entre os meios comparados e o aumento dessa fosforilação correlacionava-se negativamente com o desenvolvimento embrionário em 24, 48 e 72 horas de cultura a partir do estágio embrionário de duas células. Os dados desse estudo sugerem que os meios Quinn (para a recuperação de oócitos) e KSOM determinaram um menor grau de estresse para os embriões tanto para um intervalo de curta (24 horas) como de longa (72 horas) duração no sistema de cultura.

Diferenças no tempo de armazenamento após manufatura ou de condições de transporte de cada companhia podem ter um impacto importante sobre o FIV de camundongo, quando se utiliza um meio comercial. O armazenamento impróprio de meios de cultura que contêm aminoácidos pode resultar na quebra espontânea desses aminoácidos e liberação de amônia, a qual determina não somente a redução do desenvolvimento embrionário *in vitro*, mas também reduz significativamente as taxas de implantação e desenvolvimento fetal após a transferência dos embriões (104). A diferença das condições de transporte dos dois meios de cultura (KSOM, congelado a -20°C; G1/G2, refrigerado a 4°C) poderia ser responsável pelas alterações de osmolaridade e/ou pH do meio, o que afetaria negativamente o desenvolvimento embrionário e causaria a morte celular (105). Hadi et al. (106) compararam os efeitos do aumento da osmolaridade do meio KSOM no desenvolvimento *in vitro* de zigotos de camundongos de linhagens que apresentavam ou não um potencial maior de bloqueio no estágio de duas células e observaram que os embriões em

diferentes estágios de desenvolvimento, derivados de ambos genótipos, dependeram da osmolaridade do meio de cultura, embora os embriões sem potencial de bloqueio no estágio de duas células tivessem seu desenvolvimento bloqueado em um nível de osmolaridade maior do que aquele observado para os embriões susceptíveis a esse bloqueio. A susceptibilidade individual dos embriões ao estresse poderia explicar, pelo menos de maneira parcial, o potencial distinto de desenvolvimento em condições de cultura diferentes.

Em resumo, este estudo mostra que o meio de cultura comercial KSOM é superior ao meio seqüencial G1/G2 no modelo de FIV em camundongo, tanto em relação ao desenvolvimento de zigotos produzidos através da FIV até o estágio de blastocisto, como para a obtenção de taxas significativamente maiores de blastocistos de boa qualidade. Adicionalmente, a utilização do meio KSOM representa uma escolha efetiva do ponto de vista de relação custo-benefício para os laboratórios de pesquisa que utilizam esse modelo experimental de FIV.

A identificação dos possíveis mecanismos que ligam as PED aos seus efeitos tóxicos sobre o sistema reprodutivo é muito difícil devido à complexidade de sua composição. Seus principais componentes, os metais pesados, os compostos orgânicos e as próprias partículas, podem exercer seu efeito deletério através de vias independentes ou combinadas que levam no final à perda da integridade do órgão a nível celular. Por outro lado, a

susceptibilidade do embrião às condições ambientais e suas mudanças pode levar a respostas que podem alterar o seu desenvolvimento futuro através de alterações das vias envolvidas na expressão gênica, sinalização do ciclo celular ou apoptose (107).

Os resultados do projeto de exposição pré-concepcional de curta duração de fêmeas de camundongo às PED (nativas ou ácido-extraídas) mostraram que nenhum efeito sobre a fertilização e o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto *in vitro* ou o processo de eclosão foi observado nos grupos expostos às PED-N e PED-AE, quando comparados ao grupo exposto à solução controle. Por outro lado, tanto a solução de PED-N como a de PED-AE afetaram negativamente a especificação das linhagens celulares e a integridade morfológica da MCI dos blastocistos de maneira similar. Essa observação sugere que, apesar de se verificar uma alteração significativa da composição de compostos orgânicos e de metais pesados das PED após a extração com ácido nítrico, reduzindo seu conteúdo de HPAs e zinco, os efeitos negativos sobre o padrão de alocação das duas primeiras linhagens celulares e a integridade morfológica da MCI dos embriões no estágio de blastocisto ainda estão presentes, sugerindo a possibilidade de que esses efeitos não estariam relacionados apenas aos componentes biologicamente extraíveis das PED. O defeito da especificação das linhagens celulares e a perda da integridade morfológica dos blastocistos observados neste estudo podem sugerir uma possível via

através da qual o risco de perda da gestação inicial encontra-se aumentado em fêmeas de camundongo expostas à poluição do ar ambiente.

Apesar do mecanismo através do qual a exposição às PED poderia levar à segregação celular anormal do embrião em desenvolvimento no estágio de blastocisto ser ainda desconhecido, algumas especulações podem ser feitas. As PED poderiam determinar a expressão exagerada do fator de transcrição Cdx2, desviando as células inicialmente totipotentes do embrião para a linhagem TE, como observado neste estudo. Por outro lado, o dano oxidativo do DNA e conseqüente apoptose celular desencadeados pelas PED poderiam ser implicados na redução significativa da população celular e na perda da integridade morfológica da MCI verificados neste estudo e, portanto, influenciando negativamente a viabilidade gestacional de fêmeas de camundongo expostas à poluição.

Alternativamente, a alteração da especificação das linhagens celulares do blastocisto poderia resultar da exposição aos HPAs, componente orgânico das PED, a qual aumentaria a expressão do mediador pró-apoptótico Bax através da ativação do Ahr, um membro da família de fatores de transcrição Per-Arnt-Sim, causando a morte celular. Detmar et al. (108) mostraram em um estudo recente que a exposição de embriões em estágio inicial de desenvolvimento aos HPAs reduziu a alocação de células às linhagens embrionária e placentária através da indução de apoptose, dependente do mediador pró-apoptótico Bax, comprometendo o potencial de

desenvolvimento dos embriões expostos e resultando em taxas maiores de perda embrionária.

Embora o distúrbio da segregação das linhagens celulares do embrião no estágio de blastocisto, observado após a exposição de curta duração tanto às PED-N como PED-AE, possa ser sugerido como um possível mecanismo através do qual as PED afetam negativamente a viabilidade da gestação, certas limitações deste estudo são reconhecidas. Em primeiro lugar, não foi possível identificar qual componente das PED está associado a esse efeito uma vez que apesar da redução significativa da composição de compostos orgânicos e de metais pesados das PED verificada após a extração ácida, esses componentes ainda estavam presentes nas PED-AE e, tanto as PED-N como as PED-AE afetaram negativamente e de maneira similar a especificação celular no blastocisto. Extrações consecutivas com metanol e hexano deveriam ser realizadas para reduzir ainda mais os componentes orgânicos presentes nas PED e os efeitos dessas soluções sobre a segregação das linhagens celulares deveriam ser avaliados.

Em segundo lugar, o experimento foi realizado *in vitro*. Para generalizar esses achados à população e confirmar os resultados, esse estudo deveria ser repetido com blastocistos produzidos *in vivo*. Contudo, essa abordagem inviabilizaria a avaliação da fertilização e do desenvolvimento embrionário até esse estágio. Finalmente, embora o efeito observado possa ser ligado à perda da viabilidade da gestação, essa

hipótese não foi testada nesse estudo através da transferência dos blastocistos produzidos em cada grupo de exposição a fêmeas pseudográvidas. Novos estudos deveriam ser realizados para esclarecer essas limitações.

Concluindo, esses resultados mostram que a exposição pré-concepcional de curta duração às PED, tanto nativas como ácido-extraídas, leva ao distúrbio da segregação das duas primeiras linhagens celulares do embrião em estágio de blastocisto, reduzindo especificamente a população celular da MCI e prejudicando sua integridade morfológica, sem causar nenhum efeito sobre a fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro*. Esses achados podem ser úteis para explicar as elevadas taxas de falha de implantação e da perda inicial da gestação, verificadas em fêmeas de camundongo expostas à poluição ambiental e para identificar o mecanismo através do qual essa exposição afetaria negativamente a viabilidade gestacional. Adicionalmente, essas observações, caso confirmadas, teriam implicações importantes para mulheres que habitam em grandes centros urbanos e que são expostas a episódios de níveis elevados de poluição ambiental particulada durante o tratamento de sua infertilidade através da FIVETE.

Devido à natureza universal e inevitável da exposição à poluição particulada ambiental relacionada ao tráfego nas áreas metropolitanas, mulheres que estão tentando engravidar, espontaneamente ou não, podem

ser expostas a altas concentrações de toxinas ambientais durante esse período. Estudos experimentais prévios conduzidos em nosso laboratório forneceram evidências de que tanto a exposição de curta como de longa duração à poluição ambiental particulada têm um impacto significativo sobre a função reprodutiva feminina, afetando o desenvolvimento embrionário pré- e pós-implantacional. A exposição pré-concepcional às PED e ao MP_{2,5} presente no ar ambiente foram implicadas no distúrbio do padrão de segregação das linhagens de células MCI e TE do blastocisto, importante marcador da viabilidade e do potencial de desenvolvimento embrionário (109). Esse desenvolvimento embrionário pós-implantacional defeituoso resulta em um aumento do número de falhas de implantação, na redução do número de fetos viáveis e em maiores taxas de abortamento (59, 60, 87).

O estudo epidemiológico realizado no último projeto da minha linha de pesquisa, no qual os resultados clínicos e laboratoriais de mulheres submetidas à FIVETE, expostas (período Q₄) ou não (período Q₁₋₃) a períodos de níveis elevados de MP₁₀ ambiente (MP₁₀ > 56,72 µg/m³) durante a fase folicular do tratamento, foi incapaz de demonstrar um efeito negativo dessa exposição sobre os parâmetros de estimulação (duração, número total de ampolas de gonadotrofinas utilizadas, espessura endometrial, nível sérico de estradiol no dia da administração do hCG e número total de folículos aspirados) ou sobre os parâmetros laboratoriais (número de oócitos e taxa de oócitos maduros recuperados por paciente, fertilização, clivagem e qualidade embrionária no segundo dia de desenvolvimento e clivagem e

qualidade embrionária no terceiro dia de desenvolvimento) dos ciclos de FIVETE.

Adicionalmente, a faixa etária e o padrão de resposta à estimulação ovariana das pacientes, embora tenham afetado individualmente alguns desses parâmetros como esperado, não mostraram qualquer interação (negativa ou positiva) com a exposição aos níveis elevados do MP₁₀ ambiente sobre os resultados clínicos e laboratoriais dos ciclos de FIVETE, sugerindo que nenhum subgrupo específico de pacientes apresenta susceptibilidade diferencial a essa exposição. Esses resultados estão de acordo com o meu projeto experimental, no qual a fertilização e o desenvolvimento embrionário *in vitro* de fêmeas de camundongo expostas às PED durante a estimulação ovariana foram acompanhados. Neste estudo, verificou-se que o número de zigotos que atingiu o estágio de blastocisto e o padrão de eclosão dos blastocistos, parâmetros que refletem o potencial do desenvolvimento embrionário, não foram afetados pela exposição de curta duração às PED (nativas ou ácido-extraídas).

A análise das variáveis da transferência de embriões mostrou que não houve diferença significativa entre os subgrupos de cada faixa etária e de padrão de resposta ovariana de pacientes expostas ou não aos níveis elevados de MP₁₀ ambiente com relação ao número de embriões transferidos, taxa de desenvolvimento embrionário, escore de qualidade embrionária e taxa de implantação. Embora uma tendência de redução do

escore de qualidade embrionária em pacientes com resposta ovariana pobre à estimulação com gonadotrofinas, independentemente de sua faixa etária, tenha sido observada, esse achado não teve impacto no resultado do tratamento como foi evidenciado por taxas similares de implantação nestes subgrupos de pacientes.

Os principais parâmetros de avaliação do resultado dos ciclos de FIVETE, as taxas de gestação clínica por ciclo iniciado e por ciclo com transferência de embriões, não mostraram diferença estatisticamente significativa entre pacientes expostas ou não a níveis elevados de MP₁₀ durante o período pré-concepcional. Neste estudo, verificou-se que nenhum subgrupo específico de pacientes em relação à faixa etária ou padrão de resposta ovariana à estimulação com gonadotrofinas foi afetado negativamente por essa exposição, embora essa observação seja limitada em algumas análises devido ao número reduzido de ciclos de certos subgrupos. Observação similar mostrando que não houve diferença significativa entre as taxas de gestação de fêmeas de camundongo expostas ao ar filtrado o poluído foi encontrada em um estudo experimental realizado anteriormente em nosso laboratório, no qual os efeitos da exposição crônica ao ar ambiente de um grande centro urbano sobre a fertilidade de fêmeas de camundongo da linhagem Balb/c foram avaliados (59).

Nos últimos anos, tem se observado um número crescente de evidências e da preocupação sobre os efeitos negativos da poluição

ambiental sobre o resultado obstétrico, incluindo o crescimento intra-uterino retardado, a mortalidade intra-uterina, o parto prematuro, o baixo peso do recém-nascido e os defeitos congênitos (88-90, 110-112), embora o peso das evidências que sugerem essa causalidade seja diferente para cada uma dessas complicações como apontado por Srám et al. (113), em sua revisão. Contudo, esses estudos foram focados no período pré-natal e não pré-concepcional para determinar as janelas críticas de exposição aos contaminantes ambientais que poderiam estar ligadas ao resultado obstétrico adverso, apesar das evidências que indicam o período pré-implantacional como o período mais susceptível às alterações do desenvolvimento induzidas pela poluição ambiental (114-116). Evidências de estudos experimentais conduzidos no nosso laboratório mostraram uma associação positiva entre a exposição pré-natal ao ar ambiente poluído e perda gestacional inicial (59, 60). Essas observações associadas à falta de dados na literatura com relação aos efeitos potenciais da exposição ao ar ambiente poluído durante o período crítico de susceptibilidade representado pelo período pré-concepcional sobre o resultado gestacional inspirou-nos a investigar a possível ligação entre a exposição a altos níveis de MP_{10} durante a fase folicular e o risco de perda gestacional inicial em mulheres que engravidaram após o tratamento de FIVETE, utilizando mulheres que conceberam naturalmente pela primeira vez durante o mesmo período como grupo controle casado.

No presente estudo, observou-se que as taxas de perda inicial da gestação entre mulheres que engravidaram espontaneamente ou após a FIVETE e que foram expostas a níveis baixos de MP_{10} ambiente durante a fase folicular dos seus ciclos de concepção (período Q_{1-3}) não apresentaram diferença entre si (13,7% e 14,5%, respectivamente) e estavam de acordo com as taxas de abortamento reportadas (12-15%), que ocorrem na população geral (117). Em oposição, o risco de perda da gestação inicial em mulheres expostas a níveis elevados de MP_{10} ambiente (período Q_4) durante o período pré-concepcional foi 2,6 vezes maior do que o observado no grupo de mulheres expostas aos níveis baixos de MP_{10} ambiente (período Q_{1-3}), independentemente do modo de concepção (FIVETE, 2,32; natural, 2,72). Adicionalmente, identificou-se uma associação entre a exposição de curta duração ao MP_{10} ambiente durante o período pré-concepcional e a incidência de perda da gestação inicial. Para cada unidade de aumento do valor médio do MP_{10} ambiente durante a fase folicular houve um aumento de 3% do risco de perda da gestação inicial.

No grupo de pacientes expostas a níveis elevados de MP_{10} ambiente (período Q_4) durante o período pré-concepcional, as taxas similares de abortamento espontâneo verificadas para as pacientes que conceberam naturalmente ou através de FIVETE sugeriram que mulheres inférteis não são mais susceptíveis do que as férteis aos efeitos da exposição sobre o resultado gestacional. O benefício teórico do tratamento de FIVETE para a redução desse risco através da seleção embrionária cuidadosa e do número

aumentado de embriões transferidos não foi observado. Os resultados deste estudo transpõem para a arena clínica as observações dos estudos experimentais que mostraram uma redução significativa do número de fetos viáveis e do aumento do número de falhas de implantação em fêmeas de camundongo expostas cronicamente à poluição ambiental (59).

A razão exata para o aumento do risco de abortamento em mulheres expostas a elevados níveis de MP_{10} ambiente durante o período pré-concepcional não é conhecida. O distúrbio do padrão normal de segregação das duas primeiras linhagens (MCI e TE) e a perda da integridade morfológica da MCI em embriões no estágio de blastocisto foram documentados no segundo projeto desta linha de pesquisa, no qual os efeitos da exposição de curta duração às PED sobre a fertilização e o desenvolvimento embrionário *in vitro* foram avaliados. O número de células das linhagens MCI e TE, bem como a sua razão, influenciam o desenvolvimento, viabilidade e potencial de implantação do blastocisto. Uma relação positiva entre o número de células e morfologia da MCI e a taxa de implantação e o potencial de desenvolvimento embrionário pós-implantacional foram evidenciadas em estudos experimentais e clínicos (84, 109, 118). Baseando-se em nossos dados experimentais e nos achados deste estudo epidemiológico, pode-se hipotetizar que um defeito da especificação das linhagens celulares e a perda da integridade da MCI no blastocisto poderiam sugerir um dos possíveis mecanismos através dos quais o aumento do risco de perda da gestação inicial é verificado em

mulheres expostas a níveis elevados de MP_{10} ambiente durante o período pré-concepcional.

Este estudo beneficia-se das abordagens metodológica e estatística através das quais foi possível controlar características específicas das populações de estudo e controle que poderiam introduzir um viés na interpretação dos resultados pela associação da exposição e resultado às variáveis de confusão. A seleção de gestantes do grupo controle que tinham intervalos menstruais regulares (aproximadamente 28 dias) e data da última menstruação conhecida, confirmada através da ultra-sonografia e com a duração da fase folicular precisamente definida, que foram expostas ao MP_{10} ambiente durante o mesmo intervalo que as pacientes do grupo de estudo, reduziu significativamente a chance de erro de classificação apesar da natureza retrospectiva da análise. A alta qualidade dos dados do tratamento e dos resultados só foi possível porque estes foram armazenados em bancos de dados eletrônicos de maneira consistente durante o período do estudo, uma característica de serviços privados de assistência à saúde. Para a análise apropriada das variáveis dependentes dos ciclos de FIVETE, que apresentam uma natureza complexa e inter-relacionada, a regressão logística múltipla foi selecionada como método estatístico para avaliar os efeitos dos diferentes padrões de resposta ovariana às gonadotrofinas, de exposição e de diferentes faixas etárias, bem como suas interações, neste estudo caso-controle, eliminando a possibilidade de que um efeito observado tenha sido causado pelo acaso (erro tipo I).

O estudo apresenta certas limitações. A saúde reprodutiva representa um processo dependente do casal e, embora o papel do homem tenha sido minimizado nesse processo através da seleção de pacientes nos quais a fertilização seria obtida somente através da injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), o dano ao DNA dos espermatozoides que pode resultar da exposição intermitente ao ar poluído também poderia ser ligado ao aumento da taxa de resultado gestacional adverso (119). A avaliação da exposição foi limitada, pois se utilizou o nível de MP₁₀ ambiente derivado da média de diferentes locais da cidade, uma abordagem que poderia introduzir certo viés por não considerar diferenças microclimáticas geográficas de exposição (115). A seleção de um único poluente derivado de uma complexa mistura de compostos presentes no ar poluído para avaliar os seus efeitos sobre os resultados do tratamento de FIVETE e da gestação poderia representar outra fonte importante de viés na análise, uma vez que alguns dos efeitos reportados poderiam ser atribuídos a outros poluentes. Contudo, baseando-se nos nossos resultados prévios, que demonstraram os efeitos do MP ambiente e das PED sobre a fertilização e desenvolvimento embrionário *in vitro* e sobre a segregação das linhagens celulares no estágio de blastocisto, este estudo foi focado na avaliação dos possíveis efeitos do MP₁₀ sobre a saúde reprodutiva. Finalmente, a extrapolação dos resultados para a população geral poderia ser limitada pelo fato de que as mulheres da população deste estudo vivem em áreas de nível socioeconômico mais

elevado e têm a mesma origem étnica, duas co-variáveis importantes que podem influenciar e interagir com as condições ambientais (120, 121).

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo deste tipo conduzido para avaliar os possíveis efeitos da exposição pré-concepcional de curta duração ao MP_{10} ambiente sobre o resultado do tratamento de mulheres inférteis submetidas à FIVETE que vivem em uma grande região metropolitana. Os resultados apresentados fornecem evidências para o papel causal da breve exposição a elevados níveis de MP_{10} ambiente durante o período pré-concepcional na perda gestacional inicial, independentemente do método de concepção. O aumento de 2,6 vezes no risco desta perda durante o inverno tem importantes implicações na saúde pública e justifica a necessidade de políticas ambientais mais rígidas direcionadas à redução da poluição ambiente durante esse período. Evitar engravidar durante períodos nos quais as agências de controle ambiental alertam sobre os elevados índices de poluição ambiente seria uma medida sábia.

Os efeitos de poluentes ambientais que afetam o sistema reprodutivo e que podem causar disfunção ou doenças nesse sistema, durante toda a vida reprodutiva ou apenas no seu período final, podem resultar da exposição de embriões humanos ou de outras espécies a esses agentes no período peri-implantacional. Durante esse período, o embrião encontra-se mais sensível a fatores que introduzem risco ao ambiente intra-uterino.

Muitas vezes, o momento de exposição a um determinado nível do poluente, mais do que este nível propriamente dito, estabelece a separação entre uma exposição com ou sem risco para o desenvolvimento fetal. Contudo, uma vez identificado esse risco, a sua extensão para a saúde humana, baseando-se nos resultados de estudos em animais que avaliam os efeitos dos poluentes sobre o mecanismo reprodutivo representa ainda hoje um grande desafio. Geneticamente, o sistema reprodutivo é altamente conservado através das espécies, tornando plausível que as respostas aos estímulos nocivos sejam similares, mas as diferenças entre as espécies com relação à exposição, anatomia e metabolismo impedem uma comparação direta.

A redução do número de células do blastocisto pode afetar de maneira importante o seu desenvolvimento futuro. Essa redução da proliferação celular pode ser vista apenas como um marcador do estresse metabólico ao qual o embrião foi submetido ou como um fator significativo do comprometimento do desenvolvimento não só pré como pós-natal (incluindo a vida adulta), resultante da diminuição do número total de células-tronco das linhagens fetal e extra-embriônica (84). O distúrbio isolado do padrão de segregação das duas primeiras linhagens celulares do embrião no estágio de blastocisto decorrente da exposição de curta duração às PED e observado em um dos projetos da minha linha de pesquisa, em conjunto às observações anteriores do nosso laboratório que mostraram um aumento da taxa de abortamento em animais expostos à poluição ambiental (59, 60),

levaram-me à realização de um estudo epidemiológico desenhado especificamente para tentar transpor os achados experimentais sobre os possíveis efeitos da exposição de curta duração à poluição ambiental particulada durante o período pré-concepcional na saúde reprodutiva humana, apesar das limitações apresentadas acima.

Os achados deste estudo epidemiológico que mostraram um aumento importante do risco de perda da gestação inicial após a exposição a níveis de MP_{10} ambiente durante o período pré-concepcional, acima do limite considerado como padrão de qualidade do ar aceitável para a saúde segundo a CETESB (média anual MP_{10} : $50 \mu\text{g}/\text{m}^3$), de pacientes inférteis ou não, confirmam as observações dos estudos experimentais anteriormente realizados em nosso laboratório que apontavam para essa direção e fornecem evidências científicas sólidas da associação entre a exposição e o comprometimento da saúde reprodutiva, apesar das limitações metodológicas apresentadas acima.

A identificação desse risco aumentado contribui com os esforços crescentes por parte dos cientistas para ampliar o conhecimento e a compreensão da interface entre os agentes poluentes ambientais e a saúde reprodutiva humana. Por outro lado, um conjunto de fatores contribuiu de maneira considerável para o estado de preocupação cada vez maior por parte do público com relação a esses efeitos. O caráter universal e muitas vezes inevitável de exposição aos diferentes tipos de contaminantes

ambientais representa um desses fatores, pois muitas vezes as concentrações dessas substâncias químicas, necessárias para induzir esse tipo de efeito, estão dentro de faixas às quais certas populações estão expostas de maneira habitual. Outro fator está relacionado ao acúmulo de dados da literatura científica na última década, mostrando que inúmeros poluentes ambientais estão associados a uma redução da fertilidade em várias espécies de vertebrados. Finalmente, as implicações dessa exposição durante os períodos de desenvolvimento embrionário e neonatal, com suas repercussões sobre o potencial de fertilidade na vida adulta, completam esse conjunto de fatores.

A introdução da tecnologia envolvida nas diferentes técnicas de biologia molecular para o desenvolvimento de novas estratégias de rastreamento e de identificação de novos marcadores biológicos da toxicidade dos diferentes poluentes possibilitará não somente uma melhor compreensão dos mecanismos bioquímicos, celulares e moleculares envolvidos nesta toxicidade, monitorando as possíveis alterações das principais vias destes mecanismos, mas também a identificação de variações genéticas individuais que determinam uma sensibilidade e resposta particulares a uma exposição química específica, permitindo a identificação de subpopulações nas quais uma melhor capacidade de previsão dessa toxicidade se tornará possível. Contudo, tais avanços trarão novos desafios para a sociedade como um todo, pois as agências governamentais envolvidas na elaboração de políticas reguladoras do meio

ambiente deverão ter um grau maior de conhecimento e de compreensão para determinar o melhor uso da enorme base de dados que será produzida em um futuro próximo.

Apesar dos esforços das agências reguladoras governamentais em tornar o meio ambiente em que vivemos mais limpo, através da imposição de regras de controle para a emissão de poluentes e da determinação de níveis de exposição considerados aceitáveis para a saúde humana, dados como os observados nesta linha de pesquisa que associam a exposição à poluição ambiental ao comprometimento da saúde reprodutiva, modificam rapidamente os conceitos existentes e apontam para a necessidade de uma cooperação constante entre os cientistas, clínicos e aqueles responsáveis pelas políticas ambientais para que, através dessa aliança, a tomada de decisões nessa área seja baseada em dados científicos sólidos e não em interesses políticos ou crenças pessoais. Essa comunicação entre os diferentes grupos representa a chave para a redução do impacto adverso que a exposição aos poluentes ambientais exercerá sobre a saúde reprodutiva das gerações futuras.

6. CONCLUSÕES

As conclusões de cada um dos projetos da linha de pesquisa desenvolvida para avaliar os efeitos da exposição pré-concepcional de curta duração ao material particulado ambiental sobre o mecanismo reprodutivo feminino, incluindo o projeto de desenvolvimento do modelo animal, o estudo experimental e o estudo epidemiológico, são apresentadas abaixo de acordo com o seu respectivo projeto:

6.1. Projeto Modelo Animal

Os resultados apresentados nesse estudo demonstram claramente que o meio comercial KSOM é superior ao meio seqüencial G1/G2 no modelo de FIV em camundongo, tanto para o desenvolvimento de zigotos produzidos a partir de FIV até o estágio de blastocisto (> 90%) como para a sua qualidade, refletida pela presença de um número maior de células da MCI dos blastocistos verificado no quarto dia de cultura e pela facilitação do processo de eclosão no quinto dia de cultura após a inseminação dos oócitos. Esses dados estão em acordo com estudos prévios e sugerem que o uso do meio seqüencial G1/G2 não é necessário para a obtenção de um desenvolvimento embrionário pré-implantacional adequado. A seleção do meio KSOM como primeira escolha para o protocolo de cultura de embriões no modelo de FIV em camundongos torna-se evidente, pois esse meio propicia melhores condições de cultura para o desenvolvimento embrionário *in vitro* e diferenciação celular do blastocisto do que aquele oferecido pelo meio seqüencial G1/G2, e representa uma escolha efetiva para a relação custo-benefício em laboratórios de pesquisa que se utilizam do modelo de FIV em camundongo, pois reduz o custo dos projetos.

6.2. Projeto Instilação Nasal

A exposição de curta duração às PED leva ao distúrbio do padrão normal de segregação das duas primeiras linhagens celulares do embrião no estágio de blastocisto, reduzindo a população celular e causando a perda da integridade morfológica da MCI, sem afetar a fertilização e o desenvolvimento embrionário *in vitro*. Esses efeitos foram observados tanto para PED nativas como ácido-extraídas, indicando que os efeitos negativos dessa exposição ainda estavam presentes mesmo após alterações significativas da composição de compostos orgânicos e de metais resultantes da extração ácida das PED. A variabilidade genética da linhagem das fêmeas de camundongo utilizadas neste estudo, refletida através dos diferentes padrões de resposta à estimulação ovariana com gonadotrofinas, não alterou a susceptibilidade dos diferentes subgrupos aos efeitos das PED-N ou PED-AE sobre a especificação celular nos blastocistos. Esses achados podem contribuir para a explicação das elevadas taxas de falha de implantação e perda da gestação inicial verificadas em fêmeas de camundongo expostas à poluição ambiente e identificar uma possível via do mecanismo pelo qual essa exposição pode afetar a viabilidade gestacional. Adicionalmente, essas observações, caso confirmadas, têm implicações profundas para mulheres que habitam em grandes centros urbanos e

realizam tratamento de infertilidade durante períodos de elevada poluição ambiental particulada.

6.3. Projeto Poluição Ambiental Particulada e FIVETE

Os resultados deste estudo fornecem evidências pela primeira vez de que para mulheres inférteis que habitam em uma grande área metropolitana e são submetidas à FIVETE, a exposição pré-concepcional de curta duração a níveis maiores de MP_{10} ambiental não afetam a resposta ovariana, os resultados clínicos e laboratoriais ou o sucesso do tratamento, refletido por taxas similares de gestação e de implantação embrionária quando comparadas àquelas de pacientes expostas a níveis menores de MP_{10} ambiental. Contudo, observou-se que a exposição transitória a níveis de MP_{10} ambiental ligeiramente acima do padrão de qualidade do ar determinado pela média móvel diária anual ($50 \mu\text{g}/\text{m}^3$) foi associada a um aumento do risco de perda da gestação inicial, tanto em mulheres férteis como inférteis. Adicionalmente, esses dados sugerem que o tratamento de FIVETE foi incapaz de reduzir esse risco apesar da cuidadosa seleção embrionária e do número maior de embriões transferidos, efeitos potencialmente benéficos do tratamento. Os resultados apresentados fornecem evidências para um papel causal da exposição pré-concepcional de curta duração a níveis elevados de MP_{10} ambiental na perda gestacional inicial, independentemente do método de concepção. O aumento de 2,6 vezes do risco de perda da gestação inicial durante os meses de inverno tem implicações importantes para a saúde pública e indica a necessidade de políticas ambientais mais rígidas direcionadas para a redução da poluição

ambiental durante esse período. Evitar a concepção durante os alertas de elevados níveis de poluição ambiental emitidos pelas agências responsáveis pelo controle da qualidade do ar seria aconselhável.

7. ANEXOS

Os anexos representam os artigos científicos de cada um dos projetos da minha linha de pesquisa desenvolvida para avaliar os efeitos da exposição pré-concepcional de curta duração ao material particulado ambiental sobre o mecanismo reprodutivo feminino, que foram escritos e submetidos à publicação em revistas médicas internacionais.

7.1. Anexo A

Running Title: Commercial media and IVF mouse model.

**Comparison of the efficacy of two commercially available
media for culturing one-cell embryos in the *in vitro*
fertilization (IVF) mouse model**

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

Mariangela Maluf, 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: Paulo Marcelo Perin, 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:
paulo@ceerh.com.br).

Capsule:

Commercially available KSOM medium is superior to sequential G1/G2 media in supporting *in vitro* embryo development and blastocyst differentiation in the IVF mouse model.

Abstract

Objective: To examine the effects of two commercial media on the development of mouse ova fertilized *in vitro* to the blastocyst stage.

Design: Animal model.

Setting: Academic institution.

Animals: Eight-week old, superovulated mice.

Intervention(s): *In vitro*-derived one-cell embryos cultured up to the blastocyst stage in KSOM or G1/G2 media.

Main Outcome Measure(s): Blastocyst and hatching rates, total cell number count, and proportion of allocation of cells to the inner cell mass (ICM) and trophoctoderm (TE).

Result(s): The percentage of zygotes that developed to the blastocyst stage at 96 and 120 hours post insemination was significantly higher in the KSOM group. The percentage of blastocysts that partially or completely hatched by day five of culture was 84% and 71% for KSOM and G1/G2 groups, showing a statistically significant difference between groups. The mean number of ICM cells was 11.7 ± 4.0 and 9.2 ± 5.2 for the zygotes cultured in KSOM and G1/G2 media, revealing a significantly higher cell number in the ICM of blastocysts derived from culture in KSOM medium. The ICM/TE ratio in the blastocysts cultured in KSOM or G1/G2 media was similar in both groups.

Conclusion(s): Commercially available KSOM medium is superior to sequential G1/G2 media for culturing one-cell embryos up to the blastocyst stage in the mouse IVF model.

Key words: mouse, *in vitro* fertilization, embryo culture, blastocyst, animal model

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 as a tool for monitoring the quality of materials, culture conditions, techniques and equipment used in IVF. Recently, it has been proposed as a bioassay for evaluating potential effects of environmental contaminants, persistent or not, on fertilization and early embryogenesis (1).

Optimal IVF and embryo culture conditions depend on multiple parameters, with the genetic background of different mouse strains and the composition of culture media being the most important determinants of successful *in vitro* interaction of the gametes and subsequent embryo development (2, 3). Thus, in order to obtain adequate and consistent results from such models, the definition of the strain, especially when outbred and hybrid strains are considered, as well as the choice of the culture system, which is primarily dependent on the culture medium composition and exogenous protein supplementation, oxygen and carbon dioxide concentration, stable environment, incubation volume and density of embryos, are of paramount importance.

Although different types of media support IVF in the mouse model, many of them do not allow development beyond the two-cell stage because the relatively high concentration of glucose, needed to support sperm motility, inhibits the initial development of preimplantation mouse embryos (4, 5). This phenomenon, referred to as the “two-cell block”, is mainly dependent on the strain of the oocytes and not on that of sperm (6). This block can be overcome by adding a chelator of heavy metals such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) to the media, but its beneficial effect on embryo development *in vitro* has been restricted to the cleavage stage embryo (7). The use of a potassium-enriched simplex optimized medium (KSOM) supplemented with EDTA (0.01 mmol/l) has been shown to overcome the two-cell block in many strains of mice, allowing the growth of zygotes to the blastocyst stage (one-step culture) (8). The supplementation of essential and non-essential amino acids to KSOM improved *in vitro* embryo development of different strains of mice, increasing the rates of blastocyst formation, hatching, and total cell number (9, 10). More recently, a new generation of sequential embryo culture media, formulated with varying concentrations of carbohydrates and amino acids, has been developed taking into account the metabolic requirements and the physiological changes of the embryo throughout its development from zygote to blastocyst (two-step culture) (11). The sequential media G1/G2 developed for human embryo culture have been successfully used to culture mouse embryos up to the blastocyst stage (12, 13).

However, the “in-house” preparation of embryo culture media is both a time-consuming and expensive task, considering staff and laboratory time and the mouse bioassay quality control screening for each new batch. Thus, the use of commercially available pretested high-quality embryo culture media to consistently produce viable blastocysts in the mouse IVF model represents an attractive alternative since it allows scientists to focus on their research by relieving the workload on their laboratories.

No studies comparing the effects of commercially available culture media on the development of mouse zygotes produced *in vitro* to the blastocyst stage have been reported. Therefore, the purpose of the present study was to compare the development of mouse ova fertilized *in vitro* to the blastocyst stage using two commercial media (KSOM and G1/G2), each one based on different concepts of the physiologic and metabolic requirements of the mouse embryo. The preimplantation developmental capacity of the embryos was assessed by the blastocyst formation and hatching rates, the total cell number count, and the proportion of allocation of the cells to the inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE).

Materials and Methods

Animals

Random-bred Swiss albino mice (School of Medicine, University of São Paulo, SP, Brazil), 8-10 weeks old, 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 12L:12D photoperiod, relative humidity of $50\pm 10\%$ and temperature of $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, with balanced commercial food (Nuvital-Nutrients Ltda., Colombo, Brazil) and water available *ad libitum*. All animals were killed by cervical dislocation. 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 National Institutes of Health.

Culture Media

The medium used for the collection of oocytes from oviducts and for the isolation of the cauda epididymis and vas deferens (collection medium) was a modified human tubal fluid (mHTF #90126; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) prewarmed to 37°C . The mean pH value of this medium was 7.36 ± 0.04 in ambient air.

The medium for sperm capacitation and *in vitro* fertilization (IVF) (insemination medium) was human tubal fluid (HTF #90125; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) containing 10% serum substitute supplement (SSS #99193; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA). The mean pH value of this medium was 7.28 ± 0.04 in a humidified atmosphere of 5% CO_2 in air at 37°C .

The media used for embryo culture were either potassium-enriched simplex optimized medium with glucose and amino acids – KSOM^{AA} medium (KSOM^{AA} #MR-107, Specialty Media, Chemicon, Temecula, CA, USA) or sequential G-1/G-2TM media (G-1TM #10091/G-2TM #10092 version 3, Vitrolife AB, Gothenburg, Sweden), being both supplemented with 5 mg/mL of human serum albumin (HSA-solutionTM #10064, Vitrolife AB, Gothenburg, Sweden). The mean pH values of KSOM^{AA} and G-1/G-2TM media were 7.29 ± 0.04 and $7.29 \pm 0.03/7.29 \pm 0.05$ in a humidified atmosphere of 5% and 6% CO₂ in air at 37°C, respectively. The same batch of each culture medium was used in all experiments.

Gonadotropin Stimulation and Oocyte Collection

Fifty female mice were superovulated at 8-10 weeks of age by intraperitoneal (i.p.) injection of 10 IU of equine chorionic gonadotropin – eCG (Folligon® 1,000 IU, Intervet International, São Paulo, SP, Brazil) followed 48 hours later by an i.p. injection of 10 IU human chorionic gonadotropin – hCG (Choragon® 5,000 IU, Ferring, São Paulo, SP, Brazil). The oviducts were removed between 14 and 16 hours post-hCG and placed in prewarmed collection medium. Cumulus-oocyte complexes (COC) 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 in order to remove debris and blood, after which they were transferred to a 100µl drop of the same medium

overlayed with embryo-tested mineral oil (Oil for Embryo Culture #9305; Irvine Scientific, Santa Ana, CA, USA) in 35-mm culture dishes (Falcon #3001; Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, NJ, USA) and equilibrated overnight in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C, prior to 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 400µl 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 60-90 min at 37°C in 5% CO₂. Sperm concentration was assessed using a Makler chamber.

In Vitro Fertilization and Embryo Culture

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, USA). IVF was carried out in 100µl drops of insemination medium under mineral oil. The capacitated sperm suspension, pre-incubated as described above, was gently added to the drops containing COCs 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 four 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 in groups of 10 (experimental units) and randomly cultured in a 20µl drop of either KSOM^{AA} or G-1TM media. Embryo culture dishes were prepared the day before COC collection with drops of culture media overlaid with embryo-tested mineral oil in 35-mm dishes and equilibrated overnight on open incubator shelves in a humidified atmosphere of 5% or 6% CO₂ in air at 37°C, for KSOM^{AA} or G-1TM media, respectively. After 48 hours of culture, embryos were transferred to new dishes prepared the day before of either the same medium (KSOM^{AA}) or G-2TM medium and cultured for a further 48-72 hours to the blastocyst stage under the same gas phase conditions.

Embryo Evaluation

Examination of the embryos 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, USA) 6, 96 and 120 hours post 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. The numbers of zona-enclosed blastocysts (the blastocoel occupying at least 80% of the total embryo volume) that developed from zygotes by 96 hours and 120 hours were recorded. The hatching status of the blastocysts identified on day five, was classified and recorded as initial (herniation of the zona pellucida by less than 50% of the embryo), partial (herniation of the zona pellucida by at least 50% of the embryo) or complete. Blastocyst morphology classification was based on the criteria described by Gardner and Lane (14).

Differential Inner Cell Mass and Trophectoderm Cell Counts

By day four of culture (96 hours post insemination), differential cell counts of the inner cell mass (ICM) and trophectoderm (TE) of blastocysts produced *in vitro* were determined by a modification of a method described previously by Thouas *et al.* (2001) (15). Briefly, intact blastocysts (in groups of 3-5) were incubated for 10 seconds in 500µl of HTF medium containing 50µg/mL propidium iodide (PI) and 1% Triton X-100 (TX-100). The blastocysts were then transferred to the fixative solution containing bisbenzimidazole (H33258, Hoechst) 25 µg/mL and 100% ethanol, 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. Cell counting was performed from digital photographs of images

obtained on an epifluorescence microscope (Eclipse 90i; Nikon, Melville, NY, USA) fitted with a mercury lamp and excitation filters (460 nm for blue and red fluorescence, and 560 nm for red only).

Experimental Design and Statistical Analysis

Protocols using two different commercial culture media were studied to compare the effects of those media on the development of oocytes fertilized *in vitro* in HTF medium: a) KSOM^{AA} for 48 hours followed by culture in the same renewed medium for the next 72 hours and; b) G-1TM for 48 hours followed by culture in G-2TM for the next 72 hours. Primary end points in this investigation included: the total number of zygotes and the development rate of those zygotes into blastocysts by 96 and 120 hours post insemination, the number of zona-enclosed, initially, partially or completely hatched blastocysts at 120 hours and, the count of ICM and TE cells of 40 randomly selected blastocysts that had developed 96 hours post insemination in each culture condition.

Each group of 10 zygotes represented an experimental unit. The experimental units from each one of the 50 female mice were randomly distributed in either KSOM^{AA} or G1TM drops for culture to the blastocyst stage. Three experimental units from each one of the 50 female mice were then randomly selected to represent the developmental competence of *in*

vitro fertilized oocytes in the two culture conditions in order to minimize the individual effect of the females on overall results.

Differences in oocytes retrieved and inseminated were evaluated using Z test. Differences in the percentage of fertilized oocytes, zygotes reaching the blastocyst stage at 96 and 120 hours post insemination and, the ratio of ICM to TE in blastocysts cultured for 96 hours were determined by performing an arc sine transformation. The transformed data were analyzed using analysis of variance (ANOVA) for all pairwise differences between the means.

Categorical data regarding the hatching status of the blastocysts at 120 hours post insemination were evaluated using a chi-square (χ^2) test.

Differences in total, ICM and TE cell numbers in both culture conditions were determined by ANOVA assuming normality of residuals by modified-Levene equal-variance test. Distribution of the cell populations was displayed using notched boxplots. 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. Two medians were considered significantly different if their boxplot limits did not overlap. A computer-generated list of random numbers was used whenever randomization was necessary in this study. The data

were analyzed using NCSS 2004 software (Number Cruncher Statistical System; Kaysville, UT, USA). Alpha was set to 0.05.

Results

Oocyte Recovery and In Vitro Fertilization

Neither the average numbers of oocytes recovered and inseminated nor the proportion of oocytes with normal pronuclear formation *in vitro* showed differences in females assigned to each culture media ($p=0.27$; $p=0.63$; $p=0.94$, respectively).

Zygote Development to the Blastocyst Stage

Table 1 summarizes the developmental capacity of oocytes fertilized *in vitro* to reach the blastocyst stage by 96 and 120 hours post insemination, in either G1/G2™ or KSOM^{AA} culture media. The percentage of zygotes that developed to the blastocyst stage at 96 hours post insemination was significantly higher in the KSOM^{AA} group when compared to the G1/G2™ group ($z=11.61$; $p=0.000$). By day five of culture, the difference between the groups remained significant ($z=9.13$; $p=0.000$).

The effect of the different embryo culture protocols on the hatching process of blastocysts was evaluated at 120 hours post insemination. The data in Table 2 summarize the distributions of the different stages of the hatching process of blastocysts at 120 hours post insemination using either KSOM^{AA} or G1/G2TM media for embryo culture. The comparison of the distributions revealed a significant difference between groups ($\chi^2=65.122$; $p=0.000$). The number of zygotes cultured using KSOM^{AA} medium that developed to the blastocyst stage and at least started to hatch by day five of culture (617/657; 93.9%) was higher when compared to that of zygotes cultured using G1/G2TM medium (426/537; 79.3%). The percentage of blastocysts that partially or completely hatched by day five of culture was 84.3% (554/657) and 70.6% (379/537) for the KSOM^{AA} and G1/G2TM groups, respectively, showing a statistically significant difference between groups ($p=0.05$). On the other hand, a significantly higher ($p=0.000$) percentage of blastocysts did not start to hatch or initially hatched in the G1/G2TM group (29.4%) when compared to the KSOM^{AA} group (15.7%).

Blastocyst Differential Cell Count at 96 Hours Post Insemination

Figure 1 shows the distributions of the number of cells in the ICM and TE, the ratio of ICM to TE cells and the total number of cells of blastocysts originated from zygotes cultured in either G1/G2TM or KSOM^{AA} media. Figure 1a shows the notch of the distribution of ICM cell counts of blastocysts cultured in KSOM^{AA} medium did not overlap with the notch of ICM cell counts of

blastocysts cultured in G1/G2TM medium. The mean number of ICM cells was 11.7 ± 4.0 and 9.2 ± 5.2 for the zygotes cultured in KSOM^{AA} and G1/G2TM media, respectively, revealing a significantly higher ($p=0.02$) cell number in the ICM of blastocysts derived from culture in KSOM^{AA} medium. In Figure 1b, the notches of the distribution of TE cell counts of blastocysts produced in the two culture media overlapped indicating no difference between the medians of these two distributions. The mean number of TE cells was 36.4 ± 15.3 and 35.2 ± 11.3 for blastocysts cultured in KSOM^{AA} and G1/G2TM media, respectively ($p=0.703$). The distribution of the ratios between the ICM and TE cell numbers is shown in Figure 1c. The notches of the distributions of the ICM/TE cell ratio in blastocysts cultured in KSOM^{AA} or G1/G2TM media slightly overlapped. The ratio is lower in blastocysts cultured in G1/G2TM media (0.31 ± 0.23) when compared to that in KSOM^{AA} medium (0.38 ± 0.19), demonstrating that relatively fewer ICM cells developed compared to TE cells. However, the ANOVA of the transformed data of these ratios failed to demonstrate a significant difference between the two culture conditions ($p=0.222$). The blastocysts produced in KSOM^{AA} medium showed a wider variation in total cell number when compared to those produced in G1/G2TM media, but as depicted in Figure 1d, the notches of distributions of the total number of cells of the blastocysts produced in each culture condition overlapped, revealing no difference between the medians of these two distributions. The mean total cell number was 48.1 ± 15.9 and 44.4 ± 11.3 for blastocysts derived from zygotes cultured in KSOM^{AA} and G1/G2TM media, respectively ($p=0.237$).

Discussion

The results of the present study demonstrate that commercially available KSOM^{AA} medium is clearly superior to sequential G-1/G-2TM media in supporting the development of zygotes produced by *in vitro* fertilization to the blastocyst stage at high rates (>90%) in the mouse model. The comparison of the two embryo culture protocols shows that KSOM^{AA} medium improves not only the developmental capacity of the zygotes into blastocysts, yielding a significantly higher percentage of blastocysts by 96 and 120 hours post insemination and favoring the hatching process by day five of culture, but also the developmental quality of the blastocysts, since the ICM of blastocysts derived from culture in KSOM^{AA} medium contained significantly more cells than those derived from culture in G1/G2TM media. These results argue strongly in favor of the selection of KSOM^{AA} medium as a first line choice for the embryo culture protocol in the IVF mouse model, since it provides a better culture environment than the sequential G1/G2TM media in supporting the *in vitro* embryo development and blastocyst differentiation.

The rates of blastocyst formation in KSOM^{AA} medium at either 96 or 120 hours post insemination (83.7% and 94.1%, respectively) were significantly higher than those in G1/G2TM media (55% and 76.9%, respectively). Furthermore, embryo culture in KSOM^{AA} medium supported the development of larger proportions (94%) of hatching or hatched blastocysts from the

zygote stage. The high yield of blastocysts after culture in KSOM^{AA} medium observed in this study is consistent with published results from other groups that showed blastocyst formation rates ranging between 72% and 88% by 96 hours post insemination (16, 17), and between 83% and 88% by 120 hours post insemination (13, 18). Likewise, the hatching process of the blastocysts that developed in KSOM^{AA} medium was similar to that of Biggers *et al.* (13), who observed that the majority of the blastocysts (~98%) at least started to hatch after 120 hours of culture in this medium. Even though important differences can be pointed out in the method used in our study when compared to that in Biggers' *et al.* (13), such as the mouse strain, the *in vitro* fertilization of oocytes, and the sequential culture media with a new formulation, our data confirm the trend presented by his group that single medium protocols can be successfully employed for the culture of zygotes, produced *in vivo* or *in vitro*, up to the blastocyst stage in the mouse model. In contrast to previously published data on the use of sequential media (13, 19, 20), we observed that embryos cultured in G1/G2TM media had not only significantly lower blastocyst formation rates at both 96 and 120 hours post insemination (~55% and ~77%, respectively), but also a lower proportion of blastocysts that either partially or completely hatched after culture using this protocol (~84%).

The first two cell lineages and their ratio (ICM/TE) in the blastocyst provide specific information on its developmental and implantation potential and are important for pregnancy and development into a normal fetus (21, 22). In this

study, the comparison of the two distinct cell populations (ICM and TE cells) present in the blastocysts showed that those developed in KSOM^{AA} medium had significantly more cells in the ICM than those developed in G1/G2TM media. The mean number of ICM and TE cells (11.7 and 36.4, respectively) of blastocysts cultured for 96 hours in KSOM^{AA} medium found in our study are in accordance with those observed by Erbach *et al.* (10.0 and 34.2, respectively) comparing the development of mouse embryos in five different culture media, including SOM and KSOM (16). The decrease in the development of the ICM cell population of blastocysts cultured in G1/G2TM media implies a lower fetal development rate (23, 24). This fact was verified by Lane and Gardner (12) while studying the effect of ammonium in the culture medium on the regulation of embryo physiology and genetics. The authors observed that the increase of ammonium levels in the culture media significantly reduced the total number of blastocyst cells, specifically the ICM cell number and ICM/TE ratio, impairing the ability of the blastocysts transferred to pseudopregnant female mice to establish a viable pregnancy. Biggers *et al.* (13) demonstrated that TE cell counts and ICM/TE ratio in blastocysts cultured in either KSOM^{AA} or G1/G2TM media were not significantly different. Similar results were verified in our study. However, in contrast to our observation, those authors showed that even though the median number of ICM cells of blastocysts cultured in G1/G2TM media (median number of ICM cells=24) was lower than that of blastocysts cultured in KSOM^{AA} (median number of ICM cells=34), no significant difference between groups was demonstrated after 120 hours of culture.

The data presented here showed that the use of a single culture medium (KSOM^{AA}), in our culture conditions, proved to be the most appropriate culture strategy in the mouse IVF model to support embryo development. Given our study design, restraining all variables other than the culture media that might have an impact on the IVF outcome, this finding supports the view of some researchers (13, 18, 25) that the use of sequential media is not necessary to achieve good preimplantation embryo development, though others advocate the sequential media protocol as essential to the development of highly viable blastocysts (26, 27). The use of commercially available media in animal IVF can avoid the potential disadvantages of “in-house” prepared media such as labor-intensive and time consuming preparation, costly quality control and batch-to-batch variations, though these variations can still occur in commercially supplied media (4). Additionally, the observation that mouse zygotes can be successfully cultured in a single medium to the blastocyst stage points out important advantages over the sequential media such as the decrease in workload as less embryo handling is expected, releasing personnel to other tasks, the decrease in material and culture media consumption, the optimization of equipment use, and the simplification of the quality control process, overall reducing significantly the laboratory costs.

Based on the findings of the present study, it may be speculated that the distinct outcomes observed with the KSOM^{AA} medium versus the G1/G2TM

media could be related to the embryo itself or the handling and shipping conditions to which the media were exposed. Wang *et al.* (28) analyzed the expression of p38 mitogen activated protein kinases (MAPKs) and stress-activated protein kinase/Jun kinase (SAPK/JNK) phosphoproteins, mediators of signal transduction from the cell surface to the nucleus, in response to stress due to suboptimal media in the mouse embryo and its correlation with preimplantation development. They observed that p38MAPK phosphorylation and SAPK/JNK phosphorylation were significantly different among the compared media and the increased level of phosphorylation correlated negatively with embryo development at 24, 48, and 72 hours of culture from the two-cell stage. Their data suggested that Quinn's OCM and KSOM^{AA} media were the least stressful for either short (24 hours) or long-term (72 hours) embryo culture. The differences of each company in time of storage after manufacture or in shipping conditions might have an important impact on mouse IVF when using commercially prepared media. Improper storage of culture media containing amino acids could determine their spontaneous breakdown and the release of ammonia, which would not only reduce embryo development *in vitro* but also significantly decrease implantation and fetal development rates after transfer (14). Thus, storage conditions and manufacturers' recommended expiration dates should be carefully observed since culture media can rapidly deteriorate while stored, decreasing its ability to support embryo development. The difference in shipping conditions of the two culture media (KSOM^{AA} – shipped frozen at -20°C; G1/G2TM – shipped refrigerated at 4°C) could be responsible for changes in osmolality and/or pH

of the medium resulting in impaired embryo development or even cellular apoptosis (29). Hadi et al. (30) compared the effects of increasing osmolality of KSOM medium on the *in vitro* development of zygotes from mouse strains traditionally considered blocking and nonblocking at the two-cell stage and observed that the embryos at different stages of development, derived from both genotypes, were dependent on the culture medium osmolality, though nonblocking embryos became blocked at a higher threshold of osmolality than those considered prone to this developmental block. The individual susceptibility of embryos to stress could at least partly explain the distinct developmental potential in different culture environments.

In summary, the data presented here show that, in our culture conditions, commercially available KSOM^{AA} medium is superior to sequential G-1/G-2TM media in the mouse IVF model, both in supporting the development of zygotes produced by *in vitro* fertilization to the blastocyst stage and in yielding a significantly higher percentage of “good quality” blastocysts. These observations are in line with previous studies and suggest that the use of sequential G-1/G-2TM media is not necessary to achieve good preimplantation embryo development. Moreover, the use of a commercial single culture medium, capable of supporting adequate *in vitro* embryo development and blastocyst differentiation, represents a cost-effective choice for the embryo culture protocol in research laboratories that use the IVF mouse model, since its use implies lower overall costs.

Acknowledgments

The authors are grateful to and would like to thank Prof. Michael C. Summers for his comments on the manuscript. We would also like to thank Alessandro M. Mazzoni, B.Sc., Ph.D. for his assistance with the statistical analysis.

References

1. Harris C, Hansen J. In vitro methods for the study of mechanisms of developmental toxicology. In: Hood R, ed. *Developmental and Reproductive Toxicology – A practical approach*. Florida: CRC Press, 2006:647-95.
2. Suzuki O, Asano T, Yamamoto Y, Takano K, 1996 MK. Development in vitro of preimplantation embryos from 55 mouse strains. *Reprod Fertil* 1996;8:975-80.
3. Menezo Y. Mouse and bovine models for human IVF. *Reprod BioMed Online* 2002;4:170-5.
4. Gardner D, Lane M. Embryo culture systems. In: Trounson A, Gardner D, eds. *Handbook of In Vitro Fertilization*. Florida: CRC Press, 1999:205-64.
5. Biggers J. Thoughts on embryo culture conditions. *Reprod BioMed Online* 2002;4(Suppl1):30-8.
6. Goddard M, Pratt H. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the 2-cell block. *J Embryol Exp Morphol* 1983;73:111-33.
7. Gardner D, Lane M. Alleviation of the 2-cell block and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum Reprod* 1996;11:2703-12.
8. Lawitts J, Biggers J. Joint effects of sodium chloride, glutamine, and glucose in mouse preimplantation embryo culture media. *Mol Reprod Dev* 1992;31:189-94.
9. Ho Y, Wigglesworth K, Eppig J, Schultz R. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol Reprod Dev* 1995;41:232-8.
10. 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.
11. Barnes F, Crombie A, Gardner D, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Suikkari A *et al.* Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum Reprod* 1995;10:3243-7.

12. Lane M, Gardner D. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod* 2003;69:1109-17.
13. Biggers J, McGinnis L, Lawitts J. One-step versus two-step culture of mouse preimplantation embryos: is there a difference? *Hum Reprod* 2005;20:3376-84.
14. Gardner D, Lane M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod* 1993;48:377-85.
15. 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;3:25-9.
16. Erbach G, Lawitts J, Papaioannou V, Biggers J. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol Reprod* 1994;50:1027-33.
17. Summers M, Bhatnagar P, Lawitts J, Biggers J. Fertilization in vitro of mouse ova from inbred and outbred strains: complete preimplantation embryo development in glucose-supplemented KSOM. *Biol Reprod* 1995;53:431-7.
18. Summers M, McGinnis L, Lawitts J, Biggers J. Mouse embryo development following IVF in media containing either L-glutamine or glycyl-L-glutamine. *Hum Reprod* 2005;20:1364-71.
19. Xu J, Chan S, Lee W, Lee K, Yeung W. Differential growth, cell proliferation, and apoptosis of mouse embryo in various culture media and in coculture. *Mol Reprod Dev* 2004;68:72-80.
20. Karagenc L, Lane M, Gardner D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates mouse blastocyst inner cell mass development only when media lack human serum albumin. *Reprod BioMed Online* 2005;10:511-8.
21. Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. *J Reprod Fertil* 1990;90:279-84.
22. Leppens G, Gardner D, Sakkas D. 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* 1996;11:598-603.
23. Lane M, Gardner D. Differential regulation of mouse embryo development and viability by amino acids. *J Reprod Fertil* 1997;109:153-64.
24. 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;10:497-502.
25. Summers M, Biggers J. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update* 2003;9:557-82.
26. Pool T. Recent advances in the production of viable human embryos *in vitro*. *Reprod BioMed Online* 2002;4:294-302.
27. Gardner D, Lane M. Towards a single embryo transfer. *Reprod BioMed Online* 2003;6:470-81.

28. Wang Y, Puscheck E, Lewis J, Trostinskaia A, Wang F, Rappolee D. Increases in phosphorylation of SAPK/JNK and p38MAPK correlate negatively with mouse embryo development after culture in different media. *Fertil Steril* 2005;83(Suppl 1):1144-54.
29. Fong B, Watson P, Watson A. Mouse preimplantation embryo responses to culture medium osmolarity include increased expression of CCM2 and p38 MAPK activation. *BMC Developmental Biology* 2007;7:2-17.
30. Hadi T, Hammer M, Algire C, Richards T, Baltz J. Similar effects of osmolarity, glucose, and phosphate on cleavage past the 2-cell stage in mouse embryos from outbred and F1 hybrid females. *Biol Reprod* 2005;72:179-87.

Table 1. Developmental competence of mouse oocytes fertilized *in vitro* after culture for 96 and 120 hours in G1/G2™ and KSOM^{AA} media.

Medium	Zygotes (n)	Blastocysts	
		96 h post	120 h post
		insemination (n) ^a	insemination (n) ^b
G1/G2™	698	384 (55.0%)	537 (76.9%)
KSOM ^{AA}	698	584 (83.7%)	657 (94.1%)

^a p=0.000; ^b p=0.000 (Z test)

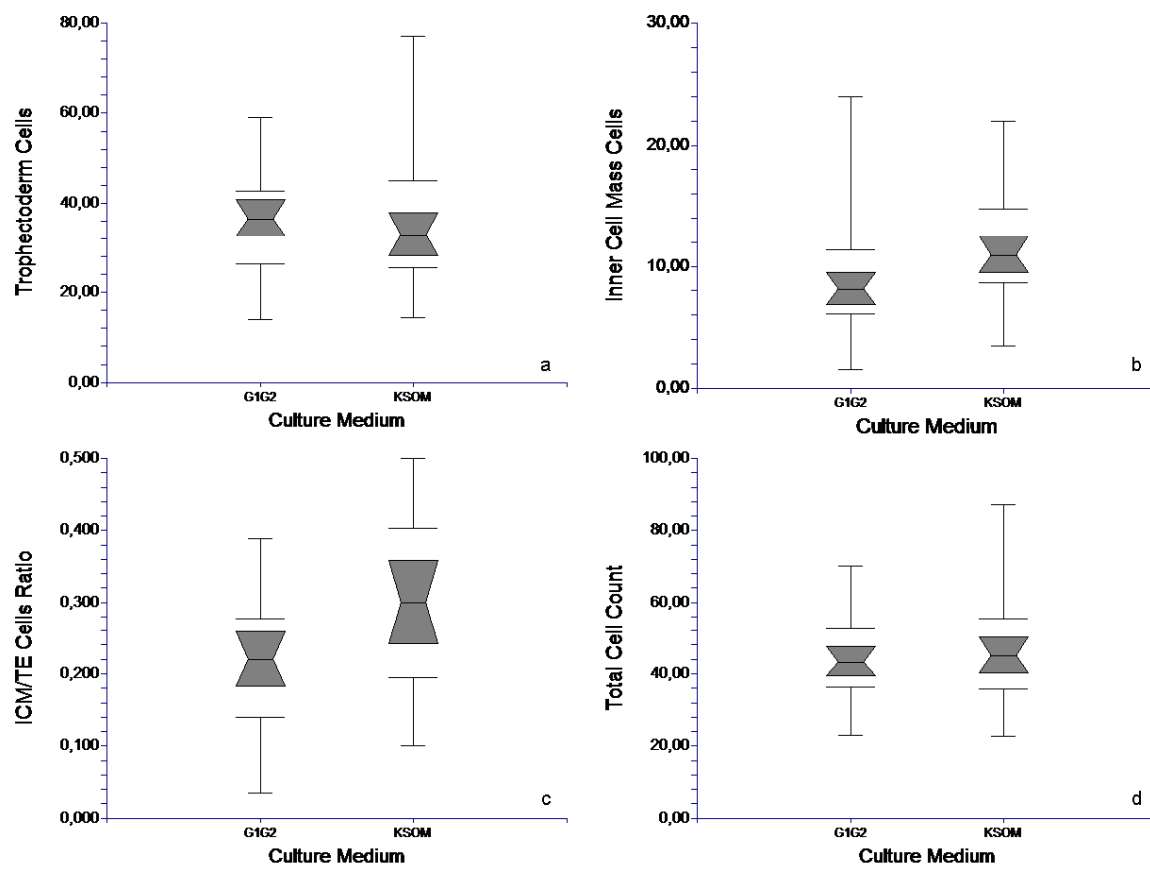
Table 2. The distributions of the different stages of the hatching process of mouse blastocysts at 120 hours post insemination after culture in G1/G2™ or KSOM^{AA} media.

Medium	Blastocysts (n)	Hatching			
		Absent (n)	Initial (n)	Partial (n)	Complete (n)
G1/G2™	537	111 (20.7%)	47 (8.7%)	213 (39.7%)	166 (30.9%)
KSOM^{AA}	657	40 (6.1%)	63 (9.6%)	363 (55.2%)	191 (29.1%)

$\chi^2=65.122$; $p=0.000$

Illustrations

Figure 1. Notched box plots depicting the distribution of the number of inner cell mass (ICM) cells (a), the number of trophectoderm (TE) cells (b), the ratio of ICM to TE cells (c) and, the total number of cells (d) in blastocysts cultured for 96 hours post insemination in G1/G2TM or KSOM^{AA} media. For explanation of box plots, see text.



7.2. Anexo B

Running Title: Diesel exhaust particles and *in vitro* embryo development

Effects of short-term exposure of female mice to diesel exhaust particles on in vitro fertilization and embryo development

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

Mariangela Maluf, 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: Paulo Marcelo Perin, 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: paulo@ceerh.com.br).

Capsule: Short-term exposure of female mice to diesel exhaust particles 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 short-term exposure to diesel exhaust particles on fertilization, embryo development, and cell lineage segregation in preimplantation blastocysts using the IVF mouse model.

Design: Animal model.

Setting: Academic institution.

Animals: Eight-week-old, superovulated mice.

Intervention(s): Intranasal instillation of distilled water (control group), native diesel exhaust particles (N-DEP group) or acid-extracted DEP (AE-DEP group) once a day, for 3 days, starting on the first day of gonadotrophin administration.

Main Outcome Measure(s): 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 trophoderm (TE), and ICM morphology.

Result(s): Ovarian response was not affected by the exposure protocol. A multivariate effect for exposure to N-DEP and AE-DEP on blastocyst differential staining and ICM morphology but not on IVF or embryo development was found. Cell counts in ICM and ICM/TE ratios in blastocysts produced in control group were significantly higher than in blastocysts produced in N-DEP and AE-DEP groups. Cell counts in TE cells in blastocysts produced in control group were significantly lower than in blastocysts produced in N-DEP and AE-DEP groups. The total cell count was similar among groups. The score that represents ICM morphology was

significantly higher in the control group when compared to that found in N-DEP and AE-DEP groups.

Conclusion(s): Our study suggests that short-term exposure to DEP may negatively affect the reproductive process by disrupting the lineage specification at the blastocyst stage.

Key words: diesel exhaust particles, *in vitro* fertilization, embryo development, blastocyst, inner cell mass, trophectoderm, lineage specification, mouse.

Introduction

Diesel-powered vehicles are still the major source of particulate matter found in ambient air of large cities despite the efforts of oil and engine manufacturers to decrease traffic emissions. People living in metropolitan areas are intermittently subject to diesel exhaust particles (DEP) throughout the day. DEP consists of carbon cores with high surface-to-volume ratio that absorb trace amounts of heavy metals such as iron, copper, chromium, and nickel and a large number of organic compounds including polyaromatic hydrocarbons (PAHs), nitroaromatic hydrocarbons, heterocyclics, quinones, aldehydes, and aliphatic hydrocarbons (1, 2). The total mass of DEP is composed of 40% of inorganic carbonaceous substance (elemental carbon, EC), 30% organic carbonaceous substances derived from unburned fuel and oil, and 30% sulfate, water, ash and others. Size distribution of DEP ranges from coarse particles (with aerodynamic diameter 2.5 to 10 μm) to ultrafine particles (with aerodynamic diameter $<0.1 \mu\text{m}$), which are dominant in the number-size distribution in contrast to the larger particles that dominate the mass-size distribution (3). The toxicity of DEP can be attributed to the heavy metals and organic compounds adsorbed to its surface, to the particle itself, or both.

The exposure to DEP originated from diesel engines has been experimentally and epidemiologically linked to a wide range of ambient-related health effects including cardio-respiratory (4, 5) and endocrine

disorders (6), allergy (7), cancer (8, 9), and male and female reproductive toxicity (6, 10, 11). In males, reproductive effects of exposure to DEP include increase in plasma testosterone levels, spermatogenesis suppression, evidenced by the decrease in elongated-type spermatids in seminiferous tubes and in daily sperm production, and increase in the incidence of morphologically abnormal sperm, overall reducing fertility (11, 12). These effects of the endocrine disruptors contained in DEP, such as PAHs, dioxin derivatives and nitrophenols, could be related to their antiandrogenic activity or through their interaction with the aryl hydrocarbon receptor (11, 13). In females, experimental evidence suggests that maternal DEP exposure was correlated with a significant increase in abortions and poor perinatal outcome (14). The possible mechanisms through which transplacental exposure to DEP could adversely affect pregnancy outcome include a significant increase in the frequency of DNA deletions in the fetus (15), changes in the expression of immune- and endocrine-related genes during early and late gestation (16), and the estrogenic activity of nitrophenols present in DEP (6).

Despite the ubiquitous nature of the DEP exposure in large urban areas and the possibility of women living in this areas to be exposed to high pollutant concentrations for a limited period of time while trying to conceive, naturally or otherwise, no studies assessing the direct effects of this exposure on early embryo development that could be linked to the poor obstetric outcome have been published to date. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the possible effects of short-term exposure to DEP 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, 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 $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, and filtered air, during the entire experiment. 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.

Diesel Exhaust Particles Collection and Preparation

Native DEP (N-DEP) were collected from a diesel particulate filter-equipped diesel engine of in-use transit buses at the end of the day and pooled

together. N-DEP was suspended in pyrogen-free sterile distilled water (B.Braun SA, Rio de Janeiro, Brazil) at a concentration of 5 mg/mL, followed by sonication for 5 min using an ultrasonic bath (Model no. 1510; Branson, Danbury, CT). Chemical compounds from the same N-DEP sample were separated by extraction with nitric acid (HNO₃ PA, no. 17078; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) solution. Briefly, five grams of N-DEP were suspended in 400 mL of HNO₃ solution (pH 3.0) and sonicated for 60 min. The sample was then centrifuged for 30 min at 850 X g at 5°C. The supernatant was removed and the pellet was dried overnight at 56°C. Acid-extracted DEP (AE-DEP) was then suspended in pyrogen-free sterile distilled water (B.Braun SA) at a concentration of 5 mg/mL, followed by sonication for 5 min. Metal and organic components in N-DEP and AE-DEP were analyzed by Prof. Olaf Malm at the Radioisotopes Laboratory of the Carlos Chagas Filho Biophysics Institute (Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil). Semi-quantitative information about elemental composition was inferred by energy dispersive X-Ray fluorescence spectrometry. Organic components were analyzed by gas chromatographic mass spectrometry.

Experimental Design

Natural cycling 8-week-old virgin females (n=60) were randomly divided into three groups according to the short-term exposure to different solutions as follows: a) Control solution – pyrogen-free sterile distilled water (Control group; n=20); b) N-DEP solution (N-DEP group; n=20); and c) AE-DEP

solution (AE-DEP group; n=20). Solutions were sonicated for 5 min before use. In each group, ten microliters of the solution were instilled into the nostril of a fully awake animal with the aid of an automatic pipette every morning for three days, starting on the first day of gonadotrophin administration according to a protocol previously described (17). This procedure triggers reflex apnea which results in deep inspiration, propelling the solution into the lungs.

In Vitro Fertilization and Embryo Culture

The IVF and embryo culture were performed according to procedures previously described (18). 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 experimental group oocytes were obtained from female 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-µL 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 (19). 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 mice were determined by a modification in a method described by Thouas *et al.* (2001) (20). Intact blastocysts (groups of 3 to 5) were incubated for approximately 10 seconds in 500 μ L of HTF medium containing 50 μ g/mL propidium iodide (PI; Chemicon) and 1% Triton X-100 (TX-100; Sigma-Aldrich, 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. Cell counting and ICM morphological evaluation 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). The ICM morphological assessment was based on a modification of the system developed by Gardner and Schoolcraft (21). The distribution of ICM cell nuclei was graded on a 3-point scale from 1 to 3 (*ICM Score*), where 1 = ICM nuclei scattered throughout the blastocyst, 2 = ICM nuclei loosely packed in a restricted region of the blastocyst, and 3 = ICM nuclei densely packed in a restricted region of the blastocyst. An observer blind to experimental protocols performed all cell counts and ICM morphological evaluations.

Statistical Analysis

The experimental unit was an individual female mouse for the assessment of the morphological development of zygotes produced by in vitro fertilization, after short-term exposure to control, N-DEP or AE-DEP solutions. 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: 21.8 ± 10.6 and 20.5 ± 9.4 , respectively), moderate (centroids: 58.7 ± 10.2 and 54.7 ± 9.8 , respectively), or high (centroids: 99.1 ± 13.0 and 85.8 ± 12.3 , 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*, and total cell count, number of ICM and TE cells, and *ICM Score* of the zygotes that had developed to blastocysts 120 hours after insemination. All percentage data were subjected to arcsine transformation. The effects of the exposure to control, N-DEP or AE-DEP solutions 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 means \pm standard deviations (SD). The data were analyzed using Statistics Package for Social Sciences version 13.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL).

Results

DEP Characterization

Table 1 shows organic and metal components present in N-DEP and AE-DEP. All organic components except benzo(b)fluoranthene measured in N-DEP were reduced in AE-DEP after nitric acid extraction. The most abundant metals found in N-DEP and AE-DEP were iron (76% and 91%), zinc (14% and 3%), calcium (4% and 1%), and cobalt (3% and 4%). The metal content of N-DEP was also altered after nitric acid extraction.

Ovarian Response to Superovulation and Exposure to DEP

Ovarian response to superovulation was absent in 5.0%, 0% and 25.0% of the mice in groups control, N-DEP, and AE-DEP, respectively. The number of females presenting low, moderate or high response to superovulation was 5 (25%), 7 (35%) and 7 (35%) in control group, 6 (30%), 8 (40%) and 6 (30%) in N-DEP group, and 4 (20%), 7 (35%) and 4 (20%) in AE-DEP group, showing that the distribution of the different patterns of ovarian response was not affected by the short-term exposure of the female mice to N-DEP or AE-DEP solutions ($X^2=8.314$, $p=0.216$).

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 lineage segregation and ICM morphology was not found (Pillai's trace = 0.62; $F = 1.17$; $p = 0.296$; power = 0.811). 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 3. No significant differences except for fertilization and fertilization rate were found for any ovarian response pattern in the univariate analysis. *Post hoc* comparison of those parameters showed a significant impairment of *in vitro* fertilization at the level of $p < 0.05$ in the high response subgroup when compared to moderate and poor response subgroups. MANOVA revealed no effects on total cell count, ICM cells, TE cells, ICM/TE ratio or *ICM Score* by ovarian response pattern as shown in Table 3.

Effects of the Exposure to DEP

A multivariate effect for short-term exposure to N-DEP and AE-DEP on *in vitro* fertilization and embryo development and on blastocyst cell segregation and ICM morphology was found (Pillai's trace = 1.06; $F = 2.97$; $p = 0.000$; 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 3. No significant differences were found for any exposure protocol in the univariate analysis. Figure 1 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 to control, N-DEP, or AE-DEP solutions. The univariate analysis of the effect of the exposure protocol on the different parameters of blastocyst cell lineage segregation and on the ICM score is shown in Table 3. The exposure protocols affected significantly the ICM and TE cell counts, the ICM/TE ratio, and the ICM score but showed no effect of the different exposure protocols on the total cell count. *Post hoc* comparison of the blastocyst cell lineage segregation parameters and the ICM score by the exposure protocol showed significant differences between groups. The cell counts in the ICM, the ICM/TE ratios, and the ICM score in blastocysts produced in the control group were significantly higher ($p < 0.05$) than in blastocysts produced in the N-DEP and AE-DEP groups. However, cell counts in the TE in blastocysts produced in the control group were significantly lower ($p < 0.05$) than in blastocysts produced in the N-DEP and AE-DEP groups (Table 4).

Table 3 shows that no significant ovarian response \times exposure protocol interaction on *in vitro* fertilization and embryo development was observed (Pillai's trace = 1.05; $F = 0.98$; $p = 0.515$; power = 0.933).

Discussion

The most relevant finding of the present study is that the short-term exposure to DEP can affect embryo development specifically through the disruption of the normal segregation pattern of the first two cell lineages at the blastocyst stage, either by the reduction of the number of cells and/or by the lack of morphological integrity of the ICM. The observation that the total cell number of blastocysts remained unchanged despite the exposure to DEP points out to the fact that the mechanism involved in the segregation process was deviated to TE cell lineage. Additionally, the impairment of the development of the ICM cell population and the loss of its morphological integrity was similar for embryos from mice exposed to either N-DEP or AE-DEP, indicating that the negative effect was still present after significant changes in organic compound and heavy metals composition derived from the acid extraction of DEP. The variable response of the ovaries to gonadotrophins, due to the genetic variability of the mouse strain selected, did not affect cell lineage segregation in blastocysts as well as did not change the susceptibility of the different subgroups to the effects of N-DEP or AE-DEP exposure on cell fate specification, though it has a negative impact on in vitro fertilization as evidenced by a significant impairment in the number of zygotes observed in the high response group when compared to moderate and poor response subgroups.

Due to the ubiquitous nature of environmental exposure in metropolitan areas and the wide range of toxic effects compromising human health, several experimental, epidemiological, toxicological, and clinical studies have been

conducted in recent years to evaluate the role of DEP exposure on several diseases. However, studies specifically addressing its reproductive toxicity are mostly focused on male (11, 12, 22, 23) or pregnancy (15, 16) rather than female aspects of reproductive health. Indirect evidences of a possible negative effect of DEP on the female reproductive function were presented in previous studies showing a cell lineage specification defect in blastocysts from mice chronically exposed to ambient fine particulate matter (PM diameter $\leq 2.5 \mu\text{m}$, PM_{2.5}) (personal communication) and a poor obstetric outcome, reflected by a significant decrease in the number of viable fetuses and an increase in the number of implantation failures and miscarriages, of mice exposed to diesel exhaust or air pollution (16, 24, 25).

No effect on in vitro fertilization, embryo development up to the blastocyst stage, or hatching process was observed in DEP-treated (native or acid-extracted) mice when compared to mice exposed to control solution. The same results were found in previous studies from our laboratory in which mice in the extreme ends of their reproductive lives were chronically exposed to ambient PM_{2.5} (personal communication). On the other hand, both N-DEP and AE-DEP solutions negatively affect cell lineage specification and ICM morphological integrity in blastocysts in a similar way. This observation suggests that despite the significant changes in the organic and heavy metal composition of DEP after acid extraction, decreasing its PAHs and zinc contents, the negative effects on the allocation pattern of the first two cell lineages and on the morphological integrity of ICM at the blastocyst stage are

still present, pointing out that these effects may not be related only to the biologically extractable components of the DEP particle. The lineage specification defect and the loss of ICM integrity observed in this study may suggest a possible pathway through which increased risk of early pregnancy loss is observed in mice exposed to air pollution.

The identification of possible mechanisms that link DEP to their reproductive toxic effects is very difficult due to the complexity of their composition. All major components, heavy metals, organic compounds and the particles themselves can exert their deleterious effects through various independent or combined pathways that ultimately lead to the disruption of organ integrity at a cellular level. Experimental data show that the ultrafine particles component of DEP can enter the circulation through pulmonary vascular endothelium and reach other target sites (26, 27). Once in the target tissue, ultrafine particles localize in mitochondria where they induce major structural damage, inducing both loss of mitochondrial membrane mass and apoptosis (28, 29). Additionally, the organic components of ultrafine particles such as PAHs and the particles themselves lead to the production of cytotoxic reactive oxygen species (ROS) which induce oxidant injury (30, 31).

The size of first two cell lineages (ICM and TE) as well as their ratio influence future growth, viability, and implantation potential of the blastocyst. A positive relationship between cell number and morphology of the ICM and the rate of embryo implantation and post-implantation developmental potential were

evidenced in experimental and clinical studies (32-34). The molecular regulation of cell lineage specification at the blastocyst stage is attributed to the function of lineage-specific transcription factors Oct4 and Nanog (ICM cell lineage) and Cdx2 (TE cell lineage) (35, 36). The proper segregation of ICM and TE lineages required for normal blastocyst development results from the control that Oct4 and Cdx2 exert on each other's expression (37). Due to differences in metabolic requirements and cell positioning the ICM cells are less resistant to embryotoxic agents than TE cells (38). The susceptibility of the embryo to environmental conditions and their changes can lead to responses that may alter its future development through disturbances in the pathways involved in gene expression, cell signaling, cell cycling or apoptosis (39).

Although the mechanism whereby exposure to DEP could lead to abnormal cell lineage segregation at the blastocyst stage of embryo development is still unknown, there are some possibilities we could speculate on. DEP could determine overexpression of the transcription factor Cdx2 leading the allocation of the initially totipotent cells of the embryo to the TE lineage, as observed in this study. On the other hand, the oxidative DNA damage and cell apoptosis triggered by DEP may be implicated in the significant decrease in the ICM cell population and in the lack of ICM morphological integrity observed in this study and thus negatively influence pregnancy viability in mice exposed to air pollution. Alternatively, the disruption of lineage specification in the blastocyst could result from the exposure to PAHs, the

organic component of DEP, through the increase of the expression of the pro-apoptotic mediator Bax, through the activation of the aromatic hydrocarbon receptor (Ahr), a member of the Per-Arnt-Sim family of transcription factors, leading to cell death. Detmar et al. (40) showed in a recent study that exposure of early embryos to PAHs reduced the allocation of the cells to the embryonic and placental lineages by inducing apoptosis in a Bax-dependent manner, compromising the developmental potential of exposed embryos and resulting in a higher rate of embryonic loss.

Even though the disruption of cell lineage segregation at the blastocyst stage, observed after short-term exposure to either N-DEP or AE-DEP, could be suggested as the possible mechanism through which DEP negatively affects pregnancy viability, we recognize some limitations of our study. First, we could not determine which component of DEP is associated with this effect since despite the significant reduction of the organic and metal components of N-DEP after acid extraction, they were still present in AE-DEP and both N-DEP and AE-DEP solutions negatively affected blastocyst cell specification in a similar way. Consecutive extractions with methanol and hexane should be performed to further reduce organic components present in DEP and the effects of these solutions on cell lineage segregation tested. Second, the experiment was performed in vitro. To generalize the findings to the population and confirm the results, we should have analyzed the cell lineage segregation of blastocysts developed from zygotes produced in vivo. However, this approach would not allow the evaluation of fertilization or

embryo development. Third, although the observed effect can be linked to the loss of pregnancy viability, this assumption was not tested in this study by transferring blastocysts produced in each exposure group to pseudopregnant mice. New studies should be designed to clarify these limitations.

Altogether, our results show that preconception short-term exposure to DEP, either native or acid extracted, leads to the disruption of the first cell lineage segregation at the blastocyst stage, specifically decreasing the ICM cell population and ICM morphological integrity, without any effect on in vitro fertilization and early embryo development. These findings may help to explain the high rates of implantation failure and early pregnancy loss seen in mice exposed to ambient air pollution and to identify the mechanism whereby it might negatively affect pregnancy viability. Furthermore, the reported observations, if confirmed, have important implications for women living in large urban areas that undergo IVF and are subject to episodes of increased PM air pollution.

Acknowledgments

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

References

1. Westerholm R, Almen J, Li H, Rannug J, Egebaeck K, Graegg K. Chemical and biological characterization of particulate-, semivolatile-, and gas-phase-associated compounds in diluted heavy-duty diesel exhausts: a comparison of three different semivolatile-phase samplers. *Environ Sci Technol* 1991;25:332 - 8.
2. Yoshino S, Hayashi H, Taneda S, Takano H, Sagai M, Mori Y. Effect of diesel exhaust particle extracts on induction of oral tolerance in mice. *Toxicol Sci* 2002;66:293-7.
3. Ono-Ogasawara M, Smith T. Diesel exhaust particles in the work environment and their analysis. *Ind Health* 2004;42:389–99.
4. Martins L, Pereira L, Lin C, Santos U, Prioli G, Luiz O *et al.* The effects of air pollution on cardiovascular diseases: lag structures. *Rev Saúde Pública* 2006;40:677-83.
5. McCreanor J, Cullinan P, Nieuwenhuijsen M, Stewart-Evans J, Malliarou E, Jarup L *et al.* Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *N Engl J Med* 2007;357:2348-58.
6. Furuta C, Suzuki A, Taneda S, Kamata K, Hayashi H, Mori Y *et al.* Estrogenic Activities of Nitrophenols in Diesel Exhaust Particles. *Biol Reprod* 2004;70:1527–33.
7. Proietti L, Spicuzza L, Polosa R. Urban air pollution at the crossroads of the allergic pandemic. *Ann Ital Med Int* 2003;18:64-72.
8. Ris C. U.S. EPA health assessment for diesel engine exhaust: a review. *Inhal Toxicol* 2007;19(Suppl 1):229-39.
9. Wichmann H. Diesel exhaust particles. *Inhal Toxicol* 2007;19(Suppl 1):241-4.
10. 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.
11. Izawa H, Kohara M, Watanabe G, Taya K, Sagai M. Diesel exhaust particle toxicity on spermatogenesis in the mouse is aryl hydrocarbon receptor dependent. *J Reprod Dev* 2007;53:1069-78.
12. Yoshida S, Sagai M, Oshio S, Umeda T, Ihara T, Sugamata M *et al.* Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *Int J Androl* 1999;22:307-15.
13. Kizu R, Okamura K, Toriba A, Mizokami A, Burnstein K, Klinge C *et al.* Antiandrogenic activities of diesel exhaust particle extracts in PC3/AR human prostate carcinoma cells. *Toxicol Sci* 2003;76:299–309.
14. Tsukue N, Tsubone H, Suzuki A. Diesel exhaust affects the abnormal delivery in pregnant mice and the growth of their young. *Inhal Toxicol* 2002;14:635-51.
15. Reliene R, Hlavacova A, Mahadevan B, Baird W, Schiestl R. Diesel exhaust particles cause increased levels of DNA deletions after transplacental exposure in mice. *Mutat Res* 2005;570:245-52.

16. Fujimoto A, Tsukue N, Watanabe M, Sugawara I, Yanagisawa R, Takano H *et al.* Diesel exhaust affects immunological action in the placentas of mice. *Environ Toxicol* 2005;20:431-40.
17. Medeiros Jr. N, Rivero DHRF, Kasahara DI, Saiki M, Godleski JJ, Koutrakis P *et al.* Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. *Environmental Research* 2004;95:62-70.
18. 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).
19. Gardner D, Lane M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod* 1993;48:377-85.
20. 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.
21. Gardner D, Stevens J, Sheehan C, Schoolcraft W. Analysis of blastocyst morphology. In: Elder K, Cohen J, eds. *Human Preimplantation Embryo Selection*. London: Informa Healthcare, 2007:79-87.
22. Watanabe N. Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. *Toxicol Lett* 2005;155:51-8.
23. Oh S, Chung K. Identification of mammalian cell genotoxins in respirable diesel exhaust particles by bioassay-directed chemical analysis. *Toxicol Lett* 2006;161:226-35.
24. 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.
25. 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.
26. Nemmar A, Hoet P, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts M *et al.* Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation* 2002;105:411-4.
27. Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A *et al.* Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A* 2002;65:1531-43.
28. Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J *et al.* Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect* 2003;111:455-60.
29. Xia T, Korge P, Weiss J, Li N, Venkatesen M, Sioutas C *et al.* Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter (PM) induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect* 2004;112:1347-58.
30. Nel A, Diaz-Sanchez D, Li N. The role of particulate pollutants in pulmonary inflammation and asthma: evidence for the involvement of organic chemicals and oxidative stress. *Curr Opin Pulm Med* 2001;7 20-6.

31. Pan C, Schmitz D, Cho A, Froines J, Fukuto J. Inherent redox properties of diesel exhaust particles: catalysis of the generation of reactive oxygen species by biological reductants. *Toxicol Sci* 2004;81:225-32.
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. 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. 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.
35. Yamanaka Y, Ralston A, Stephenson R, Rossant J. Cell and molecular regulation of the mouse blastocyst. *Dev Dyn* 2006;235:2301-14.
36. 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.
37. 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.
38. 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.
39. Li N, Nel A. The cellular impacts of diesel exhaust particles: beyond inflammation and death. *Eur Respir J* 2006;27:667-8.
40. Detmar J, Rabaglino T, Taniuchi Y, Oh J, Acton B, Benito A *et al.* Embryonic loss due to exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons is mediated by Bax. *Apoptosis* 2006;11:1413-25.

Table 1. Organic and metal components present in native (N-DEP) and acid-extracted (AE-DEP) diesel exhaust particles.

	N-DEP	AE-DEP
Organic compound (ng/g)		
Acenaphthylene	179.48	35.79
Benzo(a)anthracene	1,162.73	346.26
Benzo(a)pyrene	1,642.28	68.11
Benzo(b)fluoranthene	789.93	749.51
Benzo(k)fluoranthene	562.28	55.80
Dibenzo(a,h)anthracene	94.73	1.43
Flourene	683.94	80.37
Naphthalene	49.23	< LOD
Pyrene	12,838.27	4,457.29
Metal (%)		
Cadmium	0.185	0.078
Calcium	3.739	0.850
Chlorine	0.467	0.179
Chromium	0.143	0.153
Cobalt	3.126	3.559
Copper	0.109	0.055
Iron	76.184	90.579
Lead	0.012	0.017
Manganese	0.312	0.147
Nickel	0.186	0.083
Phosphorus	0.255	0.239
Scandium	0.391	0.093
Strontium	0.059	0.038
Sulfur	0.324	0.000
Titanium	0.360	0.436
Vanadium	0.020	0.014
Zync	14.103	3.447
Zirconium	0.024	0.033

LOD, limit of detection

Table 2. Effects of short-term exposure of female mice to either control, native diesel exhaust particles (N-DEP), or acid-extracted DEP (AE-DEP) solutions on embryo development and lineage specification according to ovarian response. For explanation of the discriminatory (*D Score*) and inner cell mass (*ICM Score*) scores, see text.

Dependent Variable	Control Solution			N-DEP Solution			AE-DEP Solution		
	Poor Responder	Moderate Responder	High Responder	Poor Responder	Moderate Responder	High Responder	Poor Responder	Moderate Responder	High Responder
Zygote	9.40±0.62	9.33±0.52	8.28±0.52	9.31±0.56	9.07±0.49	8.56±0.56	9.50±0.69	8.52±0.52	7.28±0.69
Fertilization rate	0.94±0.06	0.93±0.05	0.83±0.05	0.93±0.06	0.91±0.05	0.86±0.06	0.95±0.07	0.85±0.05	0.73±0.07
Blastocyst (96h)	7.50±0.94	7.18±0.79	7.07±0.79	6.64±0.85	7.66±0.74	7.52±0.85	9.00±1.05	7.19±0.79	6.33±1.05
Blastocyst rate (96h)	0.80±0.08	0.77±0.06	0.83±0.06	0.72±0.07	0.84±0.06	0.88±0.07	0.94±0.09	0.80±0.06	0.84±0.09
Hatching (96h)	5.10±0.97	5.77±0.82	5.77±0.82	4.20±0.88	5.70±0.76	5.83±0.88	7.33±1.08	4.85±0.82	4.72±1.08
Blastocyst (120h)	8.50±0.75	8.42±0.64	7.68±0.64	7.92±0.69	8.45±0.59	8.27±0.69	9.08±0.84	8.18±0.64	6.85±0.64
Blastocyst rate (120h)	0.90±0.04	0.90±0.03	0.91±0.03	0.86±0.04	0.92±0.03	0.97±0.04	0.95±0.04	0.95±0.03	0.93±0.04
Hatching (120h)	7.90±0.76	7.77±0.64	7.23±0.64	7.58±0.69	7.85±0.60	7.97±0.69	8.75±0.85	7.83±0.64	6.75±0.85
<i>D Score</i>	0.79±0.08	0.79±0.06	0.86±0.06	0.74±0.07	0.83±0.06	0.80±0.07	0.90±0.08	0.73±0.06	0.79±0.08
Total cell count	119.9±5.0	116.5±4.2	109.4±4.2	117.5±4.6	122.9±3.9	112.8±4.6	112.4±5.6	111.5±4.2	119.5±5.6
Inner cell mass cells	29.8±1.8	28.7±1.5	28.4±1.5	17.2±1.6	17.0±1.4	17.0±1.6	14.9±2.0	15.7±1.5	17.0±2.0
Trophectoderm cells	90.1±4.4	87.8±3.7	81.0±3.7	100.3±4.0	105.9±3.4	95.8±4.0	97.5±4.9	95.8±3.7	102.5±4.9
ICM/TE ratio	0.33±0.02	0.33±0.02	0.35±0.02	0.17±0.02	0.16±0.02	0.18±0.02	0.16±0.02	0.16±0.02	0.16±0.02
<i>ICM Score</i>	2.34±0.22	2.43±0.19	2.14±0.19	1.78±0.20	1.71±0.18	2.06±0.20	1.92±0.25	1.86±0.19	1.75±0.25

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	0.832	0.442	4.023	0.035	0.400	0.808
Fertilization rate	0.628	0.538	6.483	0.003	0.274	0.893
Blastocyst (96h)	0.071	0.931	0.481	0.621	1.010	0.412
Blastocyst rate (96h)	0.575	0.567	0.426	0.655	1.042	0.396
Hatching (96h)	0.157	0.856	0.012	0.988	1.634	0.182
Blastocyst (120h)	0.054	0.948	1.336	0.273	0.721	0.582
Blastocyst rate (120h)	0.810	0.451	0.615	0.545	0.845	0.504
Hatching (120h)	0.054	0.948	0.816	0.449	0.601	0.664
<i>D</i> Score	0.104	0.902	0.229	0.796	1.002	0.417
Total cell count	0.413	0.664	0.391	0.678	1.377	0.257
ICM cells	58.715	0.000	0.029	0.971	0.242	0.913
TE cells	11.721	0.000	0.611	0.547	1.431	0.239
ICM/TE ratio	94.397	0.000	0.514	0.601	0.184	0.946
<i>ICM</i> Score	4.998	0.011	0.011	0.989	0.794	0.536

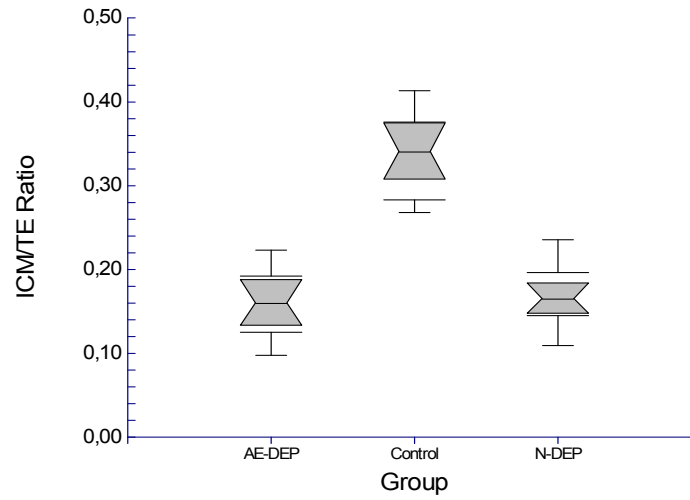
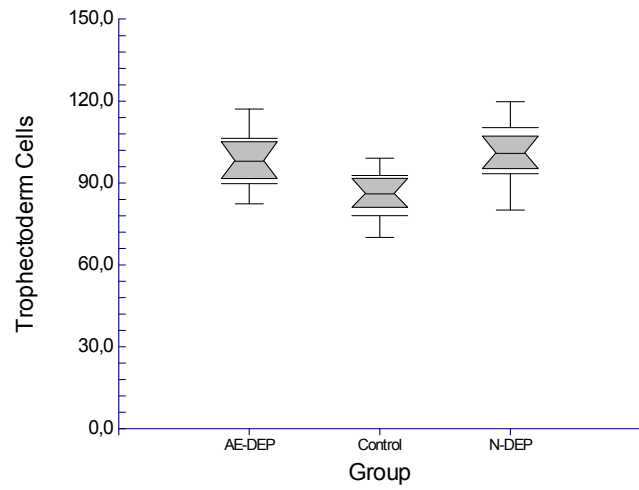
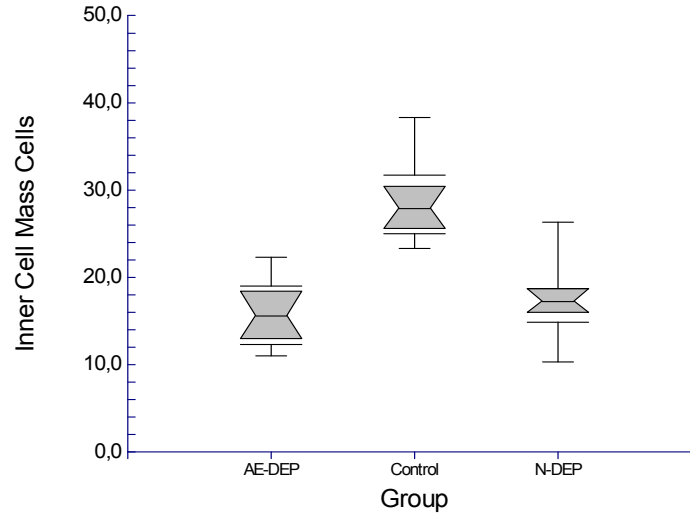
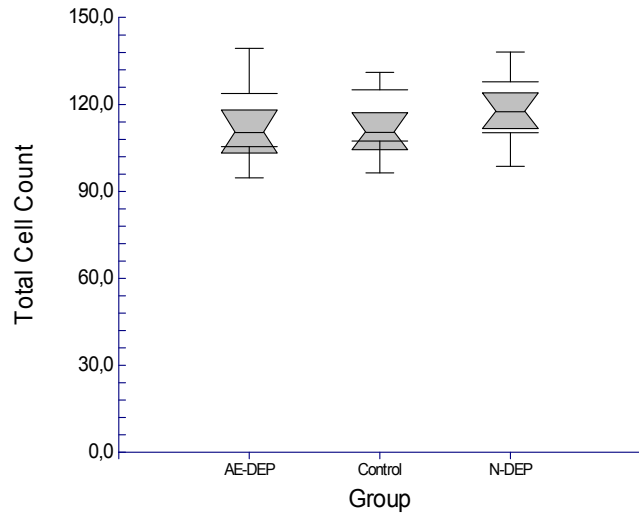
Table 4. Effects of short-term exposure of female mice to either control, native diesel exhaust particles (N-DEP), or acid-extracted DEP (AE-DEP) solutions on cell lineage specification and ICM morphology at the blastocyst stage. Exposure protocols with mean values of dependent variables showing no difference between them were grouped in homogeneous subsets.

Dependent Variable	Subset 1		Subset 2	
	Exposure	Mean±SD	Exposure	Mean±SD
Inner Cell Mass (ICM)	N-DEP	17.0±0.90	Control	29.0±0.93
	AE-DEP	15.8±1.06		
Trophectoderm (TE)	N-DEP	100.7±2.20	Control	86.3±2.26
	AE-DEP	98.6±2.60		
ICM/TE ratio	N-DEP	0.17±0.01	Control	0.34±0.01
	AE-DEP	0.16±0.01		
ICM Score	N-DEP	1.85±0.11	Control	2.30±0.12
	AE-DEP	1.84±0.13		

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

Legends:

Figure 1. 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 to control, native (N-DEP) or acid-extracted (AE-DEP) diesel exhaust particles solutions. 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.



7.3. Anexo C

Running Title: Particulate air pollution and *in vitro* fertilization outcome

Effects of exposure to high levels of particulate air pollution during the follicular phase on treatment outcome in couples undergoing in vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET)

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

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

Carlos Eduardo Czeresnia, M.D.^{c,d}

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; ^d Division of Reproductive Medicine, Célula
Mater, São Paulo, Brazil.

Conflict of interest: none

Financial support: none

Reprint requests: Paulo Marcelo Perin, 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:
paulo@ceerh.com.br).

Capsule: Short-term exposure of couples undergoing IVF/ET to high levels of particulate air pollution during follicular phase does not affect fertilization or embryo development *in vitro* but increases significantly the risk of spontaneous abortion.

Abstract

Objective: Exposure to environmental toxins may be unavoidable during preconceptional period. The effects of this exposure are unknown. We assessed the potential effects of short-term exposure to particulate air pollution during follicular phase on clinical, laboratory, and pregnancy outcomes of couples undergoing IVF/ET.

Design: Retrospective cohort study; matched case-control single-center study.

Setting: Private infertility clinic.

Patient(s): Three hundred forty-eight patients undergoing their first IVF/ET cycle. From this group, 177 women that achieved pregnancy (cases) were compared with 354 who had conceived spontaneously.

Intervention(s): The exposure to ambient particulate matter (PM) during follicular phase of each patient was estimated based on air pollution data (1997-2006) categorized in Q₁₋₃ ($\leq 56.72 \mu\text{g}/\text{m}^3$) and Q₄: ($> 56.72 \mu\text{g}/\text{m}^3$) periods.

Main Outcome Measure(s): Response to gonadotrophins, number of oocytes retrieved, fertilization, cleavage, embryo quality, implantation, pregnancy, miscarriage, and live birth rates.

Result(s): No effects of follicular phase exposure to high levels of PM on clinical, laboratory, embryo transfer or treatment outcome were found in women undergoing IVF/ET. Women exposed to Q₄ period during follicular phase of the conception cycle had significantly higher risk of miscarriage, regardless of the method of conception (odds ratio, 2.58; 95% confidence

interval: 1.63 – 4.07), when compared to women exposed to Q₁₋₃ period. The risk of miscarriage increased 3% per unit increase in follicular phase PM average (p=0.000).

Conclusion(s): The results presented here provide evidence for a causal role of brief exposure to high levels of ambient PM during the preconceptional period in early pregnancy loss, regardless of the method of conception, and was associated with a 2.6-fold increase in risk of miscarriage. Despite the absence of effects of this exposure on clinical, laboratory, and treatment outcome, IVF/ET was unable to reduce this risk.

Key words: in vitro fertilization; particulate air pollution; fertilization; embryo development; embryo quality; implantation; miscarriage.

Introduction

In humans, the success or failure of the reproductive process translates the delicate balance of numerous factors such as age, behavior, heredity, hormonal and nutritional status, patency of the reproductive tract, gamete reserve and production, embryo development and quality, and uterine receptivity acting in combination. The preimplantation period of development represents a critical time during which the embryo is highly susceptible to exogenous insults that can affect future growth and developmental potential, either pre- and/or postnatally (1). Abnormalities in developmental potential may arise from the unavoidable maternal exposure to environmental toxicants during the periconceptional period affecting not only reproductive but also pregnancy outcome and/or postnatal life (2).

Over the past few years, an increasing amount of evidence derived from studies particularly focused on male fertility and pregnancy outcome showed the negative effects of environmental contaminants derived from traffic emissions, including ozone (O₃), carbon monoxide (CO), sulfur dioxide (SO₂), nitrogen dioxide (NO₂), benzene, formaldehyde, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), and suspended particulate matter (PM), present in urban air on human reproductive health (3-8). In contrast, few studies were able to demonstrate an association between air pollution and fertility impairment in women, probably due to the multiplicity of factors involved on the female reproductive function (9-11). Additionally, little is known regarding

the impact of preconceptional exposure to metro area ambient air on early embryo development (10).

The advent of fertilization and embryo culture in vitro introduced in clinical practice opened a fundamental window for the observation of unique reproductive and developmental events of the preimplantation embryo that occur immediately before implantation. The possibility to closely monitor different aspects of gametes interaction and early embryo development in regard to cell division, morphology and quality (regularity, symmetry, fragmentation, multinucleation) turned either animal or human in vitro fertilization and embryo transfer (IVF/ET) into a relevant model for evaluating the preimplantation effects of acute or chronic exposure to ambient air pollution on reproduction.

Previous experimental studies conducted in our laboratory have provided evidence that both short- and long-term exposure to particulate air pollution has a significant impact on female reproductive function affecting pre- and post-implantation embryonic development. Preconception acute exposure to diesel exhaust particles and chronic exposure to fine PM (diameter $\leq 2.5 \mu\text{m}$, $\text{PM}_{2.5}$) present in ambient air were implicated in the disruption of the segregation pattern of the inner cell mass and trophectoderm cell lineages at the blastocyst stage, an important marker of embryo viability and developmental potential (personal communication) (12). Defective post-implantation embryonic development resulted in an increased number of

implantation failures, decreased number of viable fetuses, and higher rates of miscarriage (8, 10).

Despite the ubiquitous and unavoidable nature of traffic-related particulate air pollution exposure in metropolitan areas and the possibility of women trying to conceive, naturally or otherwise, being exposed to high concentrations of environmental toxins during this period, no studies focused on the effects of this exposure on early embryo development have been reported so far.

Therefore, the current study was designed to assess the potential effects of short-term exposure to particulate air pollution during follicular phase on clinical and laboratory outcomes of women undergoing their first IVF/ET cycle. Additionally, it was also designed to explore the impact of this exposure on pregnancy outcome in infertile women evaluating the possible role of IVF/ET treatment on this outcome, using women who had conceived spontaneously during the same time frame as a matched control group.

Materials and Methods

Study Population

The study was performed in two phases and approval from our institutional review board was obtained for both of them. In the first part of this study, clinical and laboratory data from 400 patients consecutively undergoing their first ever IVF/ET cycle at our center between January 1, 1997 and December

31, 2006 were retrospectively collected from our IVF database. From this group, we excluded patients with: 1) no ovarian response to gonadotrophins (n = 27); 2) no oocytes recovered at retrieval (n = 12); 3) fertilization failure (n = 5); or embryo cleavage failure (n = 8). Thus, the study cohort consisted of 348 patients who underwent embryo transfer 72 hours after oocyte retrieval (day 3), 87 percent of the original total. The median age of the women was 35 years (range, 19 to 45). For the second part, we decided to perform a case-control study to compare the outcome of clinical pregnancies achieved after IVF treatment in the prior retrospective cohort study population (case group; n = 177) with the outcomes in a similar group of women who had spontaneously conceived (control group; n = 354). The median age of the women in this population was 34 years (range, 23 to 45). Pregnancies in control group were selected from our obstetric database if they met the following criteria: 1) first pregnancy; 2) maternal age at the time of last menstrual period (LMP) no more than 6 months apart from that of the case; 3) certainty regarding the date of LMP and ultrasound dating in early pregnancy; 4) regular menstrual cycle of normal length (28 ± 2 days) before pregnancy; 5) similar LMP ($LMP \pm 2$ days) for every patient in the control group with regard to case group; and 6) same ethnic origin (Caucasian) and socio-economic stratum as in case group. If more than one match was available, the patient whose LMP was closest to that of the case subject was selected. Once matches were identified as eligible, their relevant data were recorded and to avoid ascertainment bias pregnancy outcome remained unknown to the investigators until analysis. Patients had no previous history

of chronic diseases, medications, and abuse of alcohol or drugs. All couples were nonsmokers and lived in São Paulo metropolitan area, São Paulo, Brazil in both groups. Written informed consent was provided by all participants.

Ambient Air Pollution Monitoring

Daily records of O₃, NO₂, CO, SO₂, and PM of less than 10 µm in aerodynamic diameter (PM₁₀) concentrations were provided by the São Paulo State Environmental Protection Agency (CETESB) between January 1997 and December 2006, São Paulo, São Paulo, Brazil (13). Exposure measurements during the study period were taken from 14 monitoring stations covering nearly all areas of the city, although not all of them measured all pollutants, from 1:00 am to 12:00 pm. Automobile exhaust emission was the major source of air pollution in the study area. The arithmetical average of pollutants across all monitoring stations was considered representative of the citywide exposure status. Seven stations measured the highest 8-hour moving average levels of CO. NO₂ and O₃ levels were computed as the highest hourly average in seven and six stations, respectively. Each station measured average hourly levels of PM₁₀ and SO₂ and the 24-hour average was adopted for these pollutants. Daily data on weather conditions, including minimum and maximum temperatures and average relative humidity, were obtained from the Institute of Astronomy and Geophysics (IAG), University of São Paulo, São Paulo, Brazil. The short-

term PM₁₀ average concentration for the 14 days postdating each patient's last menstrual period (LMP) was determined as the average follicular phase exposure both in case and control groups to represent the exposure of interest.

Ovarian Stimulation and Oocyte Retrieval

All patients underwent standard long protocol down-regulation using a dose of 1 mg of a gonadotrophin-releasing hormone agonist (GnRH-a, Lupron; Abbott, São Paulo, São Paulo, Brazil), which was reduced once recombinant human follicle-stimulating hormone (rhFSH, Puregon; Organon, São Paulo, São Paulo, Brazil) and/or human menopausal gonadotrophin (hMG, Menogon; Ferring, São Paulo, São Paulo, Brazil) administration was initiated. The dose of gonadotrophin was individualized according to the patient's age and response. Ovarian response was assessed by serial transvaginal sonography and serum estradiol (E₂) levels. Final oocyte maturation and ovulation were triggered with 10,000 international units (IU) intramuscular injection of human chorionic gonadotrophin (hCG, Choragon; Ferring), when lead follicles reached 18 to 20 mm in diameter. Peak E₂ level was measured on the day of hCG administration. Transvaginal ultrasound-guided oocyte retrieval under sedation was scheduled 35 to 36 hours after hCG administration.

Oocyte Fertilization, Embryo Culture and Transfer, and Luteal Phase

Support

Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) and embryo culture were performed in all cycles according to procedures previously described (14). Briefly, ICSI was performed on day 0 in all morphologically intact mature (metaphase II; MII) oocytes following previous description (15). Fertilization assessment was carried out 18-20 hours (day 1) after ICSI. Oocytes presenting two pronuclei (2PN) and two polar bodies were considered normally fertilized. All cleaving embryos were evaluated, on days 2 (42-45h) and 3 (68-72h) after ICSI, for: a) number, regularity and symmetry of blastomeres; b) fragmentation (score) – 1: $\leq 10\%$ of anucleated fragments, 2: 11-30% of anucleated fragments, 3: $>30\%$ of anucleated fragments; and c) presence (at least one blastomere exhibiting >1 nucleus) or absence of multinucleated blastomeres (MNB). The embryo quality score was based on the criteria described by Veeck in which the lowest score represents the best-quality embryo (16). Embryos were classified as being of high quality when they had four to six symmetrical blastomeres with $\leq 10\%$ fragmentation and no multinucleation on day 2, and six to eight symmetrical blastomeres with $\leq 10\%$ fragmentation and no multinucleation on day 3. Immediately before transfer, the selected embryos were scored according to quality and fragmentation and the embryo development rate (the sum of the number of blastomeres of each embryo transferred divided by the number of embryos transferred per patient) was calculated. Up to four embryos were transferred into the uterine cavity under

transabdominal ultrasound guidance 72 hours after oocyte retrieval. Luteal phase support was initiated on the day of oocyte retrieval in the form of intravaginal natural micronized progesterone (Utrogestan, Besins Iscovesco Laboratoires; Paris, France) at a dose of 800 mg daily and maintained at this dose until a serum pregnancy test was done two weeks after embryo transfer. If it was positive (β hCG > 25 mIU / mL), transvaginal sonography was performed three weeks later to confirm the clinical pregnancy, evidenced by fetal heart activity, and to establish the number of gestational sacs. Micronized progesterone supplementation was provided for another six weeks in those achieving pregnancy.

Outcome Measures

For case patients, the clinical outcome measures were ovarian response pattern to gonadotrophins, duration of ovarian stimulation (in days), amount of gonadotrophins used per treatment cycle (total dose in IU), endometrial thickness measured by transvaginal ultrasound and peak E2 level (in pg / mL) both determined on the day of hCG administration, and the total number of follicles aspirated on the day of oocyte retrieval (day 0). The laboratory outcome measures included the number of oocytes retrieved per patient, the rate of MII oocytes on day 0 (MII oocytes / total number of oocytes retrieved), the fertilization rate on day 1 (MII oocytes injected / total number of MII oocytes), day 2 embryo cleavage rate (cleaved embryos on day 2 / number of zygotes on day 1), day 2 high quality embryo rate (high quality embryos /

number of embryos on day 2), day 3 embryo cleavage rate (cleaved embryos on day 3 / number of zygotes on day 1), day 3 high quality embryo rate (high quality embryos / number of embryos on day 3). The embryo transfer and treatment outcome measures included the number, embryo development rate, grade of embryos transferred, pregnancy rate, number of implanted embryos, and implantation rate (number of fetal hearts in activity / number of embryos transferred). For both case and control patients, pregnancy outcome measures were first trimester loss (fetal loss before 12 weeks) or term pregnancy (delivery \geq 37 weeks of gestation).

Study Design

We calculated monthly average concentrations for PM₁₀ throughout the study period (1997-2006) and plotted all available data against time (Figure 1). PM₁₀ was categorized into quartiles (Q₁: \leq 30.48 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, Q₂: 30.49-42.00 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, Q₃: 42.01-56.72 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, and Q₄: $>$ 56.72 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) and exposure risk was divided into two periods according to the months of the year in which average concentrations and confidence intervals for PM₁₀ were in the upper quartile (Q₄ period) or not (Q₁₋₃ period) and exceeded CETESB's health-based national air quality standard of 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ annual mean (13). The Q₄ period coincided with winter months (June through August) in Brazil. Based on the first day of LMP we used the follicular phase (~14 days in average) of each patient (cases and controls) to determine their exposure risk period. Patients were also categorized by age into two strata ($<$ 35 and \geq 35 years

old). Patients undergoing IVF/ET had the pattern of their ovarian response to superovulation identified and grouped through the K-means cluster analysis method performed on the number of oocytes retrieved and inseminated as poor (centroids: 5.2 ± 2.6 and 3.8 ± 1.9 , respectively), normal (centroids: 12.2 ± 2.7 and 9.4 ± 2.3 , respectively), or high (centroids: 22.5 ± 4.3 and 17.1 ± 3.9 , respectively) responders. Thus, the effects of follicular phase exposure to PM_{10} levels during Q_{1-3} and Q_4 periods on in vitro fertilization and embryo development of case patients and on pregnancy outcome of case and control patients were evaluated.

Statistical Analysis

Descriptive summaries of clinical and laboratory outcomes were expressed as means \pm standard deviations (SD). PM_{10} was treated as both a continuous and a categorical variable. PM_{10} was categorized into quartiles and exposure in the lower quartile was used as the reference category.

For the first phase of the study, categorical data regarding ovarian response to superovulation in each exposure group and IVF treatment outcome in each age range and exposure group were evaluated using a chi-square test. Since the outcome of IVF treatment is highly dependent on patient's age and ovarian response, they were treated as independent variables. The effects of the ovarian response, age range, and follicular phase PM_{10} exposure period as well as the interactions between them on each dependent variable were

evaluated performing a multivariate analysis of variance (MANOVA).

Multivariate logistic regression was used to evaluate the effect of age range, ovarian response, and follicular phase PM₁₀ exposure period on treatment outcome.

For the second phase, the risk of early pregnancy loss in the study population was compared with that in the control group by the Mantel-Haenszel method. Homogeneity of rate ratios between study and control groups was tested with Mantel-Haenszel test for heterogeneity. Multivariate logistic regression analysis was used to evaluate the effect of follicular phase PM₁₀ exposure period on pregnancy outcome. For multivariate logistic regression analyses age was used as a covariate. The effect of follicular phase PM₁₀ exposure either as a continuous or a categorical variable was expressed as an odds ratio (OR) with 95% confidence intervals (CI) and associated p values.

Data are expressed as means \pm standard deviations (SD). The data were analyzed using Statistics Package for Social Sciences version 13.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL).

Results

Ovarian Response to Superovulation

In the group of patients younger than 35 years, ovarian response to superovulation was absent in 5.2% and 3.8% treatment cycles in which follicular phase exposure to PM₁₀ occurred during Q₁₋₃ and Q₄ periods, respectively. In patients 35 years old or older, ovarian response to superovulation was absent in 8.6% and 8.9% cycles for Q₁₋₃ and Q₄ periods, respectively. Patients from both age ranges showed no difference among the four distinct ovarian response patterns when Q₁₋₃ and Q₄ periods were compared (Table 1).

Clinical and Laboratory Outcome

Means (\pm SD) for all clinical, *in vitro* embryonic development, and embryo transfer variables according to ovarian response pattern and age range for each follicular phase PM₁₀ exposure period are reported in Table 2.

Effects of Ovarian Response

A multivariate effect for ovarian response on clinical, laboratory, and embryo transfer variables was found (Pillai's trace = 0.90; $F = 15.28$; $p = 0.000$; power = 1.000). A significantly lower endometrial thickness and peak E2 level on the day of hCG administration, and reduced numbers of aspirated follicles and oocytes retrieved were observed in poor responders. No significant differences were found for any laboratory variables in the univariate analysis. In regard to embryo transfer variables, the analysis showed significantly

lower embryo grade and development rate, and number of embryos transferred for poor responders. However, no difference was found for the implantation rate when the patients in different groups of ovarian response were compared.

Effects of Patient's Age

A multivariate effect for age range on clinical, laboratory, and embryo transfer variables was found (Pillai's trace = 0.26; $F = 6.61$; $p = 0.000$; power = 1.000). A significantly higher gonadotrophin consumption and significantly reduced numbers of aspirated follicles and oocytes retrieved were observed in women 35 years or older. No significant differences were found for any laboratory variables in the univariate analysis. In regard to embryo transfer variables, the analysis showed significantly lower embryo grade and implantation rate for the older age stratum.

Effects of Follicular Phase PM₁₀ Exposure Period

A multivariate effect for follicular phase PM₁₀ exposure period on clinical, laboratory, or embryo transfer variables was not found (Pillai's trace = 0.02; $F = 0.45$; $p = 0.972$; power = 0.811).

No significant follicular phase PM₁₀ exposure period x ovarian response (Pillai's trace = 0.08; $F = 0.74$; $p = 0.859$; power = 0.766), follicular phase

PM₁₀ exposure period x age range (Pillai's trace = 0.06; $F = 1.17$; $p = 0.286$; power = 0.784), ovarian response x age range (Pillai's trace = 0.09; $F = 0.93$; $p = 0.583$; power = 0.882), and follicular phase PM₁₀ exposure period x ovarian response x age range (Pillai's trace = 0.13; $F = 1.35$; $p = 0.093$; power = 0.982) interactions on clinical, laboratory, or embryo transfer variables were observed.

IVF Treatment Outcome

Treatment outcome according to the follicular phase PM₁₀ exposure period and age range in women undergoing IVF treatment is shown in Table 3. The multivariate logistic regression test showed that clinical pregnancy rates per cycle started and per embryo transfer were not significantly influenced by Q₁₋₃ and Q₄ exposure periods or ovarian response pattern. On the other hand, age range significantly affected the IVF/ET treatment outcome as evidenced by the reduction in pregnancy rate as age increases (Wald Z-value = 4.166; $p = 0.000$; OR: 2.57; CI: 1.65 - 4.01).

Pregnancy Outcome

The role of IVF/ET treatment on the effect of follicular phase PM₁₀ exposure period on pregnancy outcome was evaluated for the second phase of the study. A total of 531 pregnant women were included in the analysis: 177 patients that conceived after IVF/ET (cases) and 344 patients that conceived

spontaneously (controls) for the first time. Among case patients, 124 and 53 had their follicular phase during Q₁₋₃ and Q₄ periods, whereas among the controls there were 248 and 106 patients in each period, respectively. The live birth rate was 81% for both case and control patients. The Mantel-Haenszel test was used to explore the differences in early pregnancy loss rates among patients that conceived either spontaneously or after IVF/ET treatment and were exposed to Q₁₋₃ or Q₄ periods during the follicular phase of their conception cycle. The odds ratio obtained was 2.58 (95% CI: 1.63 – 4.07; $\chi^2 = 16.75$; $p = 0.000$), showing that for women exposed to Q₄ period during the follicular phase of their conception cycle the risk of early pregnancy loss was increased 2.6-fold, regardless of the method of conception. Odds ratios were 2.72 (95% CI: 1.51 – 4.89) and 2.32 (95% CI: 1.00 – 5.43) for controls and cases, respectively, and no heterogeneity was observed across groups. For the logistic regression model, an increase in the odds of early pregnancy loss with increasing follicular phase PM₁₀ exposure was observed. Adjusting for age covariate, the risk of early pregnancy loss increased 3% per unit increase in follicular phase PM₁₀ (Wald Z-value = 17.97; $p = 0.000$; OR: 1.03). No significant modification in the risk of early pregnancy loss according to baseline exposure (first PM₁₀ quartile) was seen for each interquartile range increase up to the third quartile. However, follicular phase exposure to PM₁₀ average level observed in the last quartile increased significantly the odds ratio (Wald Z-value = 5.53; $p = 0.019$; OR: 2.90) for early pregnancy loss in the pregnant population (Figure 2).

Discussion

In this study we first examined the effect of preconceptional short-term exposure to PM₁₀ in a real-world situation on clinical and laboratory outcomes of couples undergoing their first IVF/ET cycle, followed by a case-control analysis on those patients who became pregnant after treatment to explore the impact of the short-term exposure to particulate air pollution on pregnancy outcome in infertile women evaluating the possible role of IVF/ET treatment on this outcome, using women who had naturally conceived for the first time during the same time frame as a matched control group. The results of this study provide evidence that for infertile women living in a large metropolitan area and undergoing IVF/ET treatment, short-term preconceptional exposure to higher concentrations of ambient PM₁₀ does not affect ovarian response, clinical and laboratory outcomes or treatment outcome as reflected by similar pregnancy and implantation rates. However, we found strong evidence that the transient follicular phase exposure to ambient PM₁₀ levels slightly above the air quality standard measured as a 24 hour running average (50 µg / m³) was associated with an increased risk of early pregnancy loss, either in fertile or infertile patients. Furthermore, we observed that IVF/ET treatment was unable to reduce this risk despite careful embryo selection and increased number of embryos transferred, both important potential benefits of the treatment.

When comparing the clinical and laboratory data from women undergoing IVF/ET that were exposed (Q₄ period) or not (Q₁₋₃ period) to increased levels of ambient PM₁₀ (> 56.72 µg/m³) during the follicular phase of the treatment, we were unable to find a negative effect of the exposure either on IVF stimulation parameters (stimulation days, ampules of gonadotrophins used, endometrial thickness and peak E2 level on the day of hCG administration, and the total number of follicles aspirated on the day of oocyte retrieval) or on laboratory parameters (number of oocytes retrieved per patient and the rates of MII oocytes, fertilization, day 2 embryo cleavage and high quality, and day 3 embryo cleavage and high quality). Additionally, the patient's age range and response to controlled ovarian hyperstimulation, although individually affecting some of these parameters as expected, did not show any interactions (neither positive nor negative) with the exposure to increased levels of ambient PM₁₀ in the IVF clinical and laboratory outcomes, suggesting that no specific subgroup of patients presents differential susceptibility to this exposure. These results are in accordance with a previous experimental study from our laboratory in which we followed the fertilization and embryonic development in vitro of mice exposed to diesel exhaust particles (DEP) during ovarian stimulation and found that the number of zygotes that reached the blastocyst stage and the blastocyst hatching pattern, both parameters reflecting the embryonic developmental potential were not affected by short-term exposure to native or acid-extracted DEP (personal communication).

The analysis of embryo transfer variables in this study showed that there were no statistically significant differences between subgroups of patients in each age range and ovarian response pattern exposed (Q_4 period) or not (Q_{1-3} period) to increased levels of ambient PM_{10} in regard to the number of embryos transferred, embryo development rate, embryo quality score, and implantation rates. Although there was a trend towards decreased embryo quality score (reflected by a higher score value) in younger and older poor responders exposed to high levels of ambient PM_{10} that could be translated into a lower pregnancy potential, it has no impact on treatment outcome as evidenced by similar implantation rates in these subgroups of patients.

The main IVF/ET treatment outcomes measured, clinical pregnancy rate per cycle started and per embryo transfer, did not reveal a statistically significant difference between patients exposed (Q_4 period) or not (Q_{1-3} period) to increased levels of ambient PM_{10} during the preconceptional period. We found that no specific subgroup of patients in regard to age range and ovarian response pattern was negatively affected by this exposure, although this observation is limited in some analyses due to the small numbers of cycles in specific subgroups. A similar observation was found in a previous experimental study that evaluated the effects of chronic exposure to air pollution in a large urban center on the fertility of Balb/c female mice showing that there was no significant difference in the pregnancy rates of mice exposed to clean or polluted air (10).

In recent years, there is a large body of evidence and an increasing concern about the negative effects of air pollution on pregnancy outcomes such as intrauterine growth retardation, intrauterine mortality, preterm birth, low birth weight, and birth defects (3, 5, 7, 17-19), though the strength of the evidence suggesting causality differs between outcomes as pointed out by Srám et al (20). However, these studies have focused on specific prenatal rather than preconceptional periods to determine critical windows of exposure to environmental contaminants that could be linked to the poor pregnancy outcome despite evidences showing the preimplantation period as the most susceptible to developmental changes induced by air pollution (21-23). Evidences from experimental studies conducted on our laboratory pointed out the positive association between prenatal exposure to ambient air pollution and early pregnancy loss (10, 24). These observations and the lack of data in the literature concerning the potential effects on pregnancy outcome of the exposure to ambient air pollution during a critical window of susceptibility represented by the preconceptional period, prompted us to further investigate a possible link between follicular phase exposure to high PM₁₀ levels and the risk of early pregnancy loss in pregnant women that conceived after IVF/ET treatment, using women who had naturally conceived for the first time during the same time frame as a matched control group.

In the current study we found that early pregnancy loss rates among patients that conceived either spontaneously or after IVF/ET treatment and were exposed to Q₁₋₃ periods during the follicular phase of their conception cycle

were similar (13.7% and 14.5%, respectively) and in accordance with the rates of reported miscarriage (12-15%) that occur in the general population (25). Conversely, the risk of early pregnancy loss in women exposed to high levels of ambient PM₁₀ (Q₄ period) during the preconceptional period was 2.6-fold higher than expected in the group of women exposed to lower levels of ambient PM₁₀ (Q₁₋₃ periods) independently of the mode of conception (by IVF/ET, 2.32; by spontaneous conception, 2.72). Additionally, we identified an association between short-term exposure to ambient PM₁₀ during the preconceptional period and the incidence of early pregnancy loss. For each unit increase in follicular phase PM₁₀ average there was a 3% increase in the risk of early pregnancy loss. In the group of patients exposed to high levels of ambient PM₁₀ (Q₄ period) during the preconceptional period, the similar rates of spontaneous miscarriage observed in patients that achieved pregnancy spontaneously or through IVF/ET (30.2% and 28.3%, respectively) led us to conclude that infertile women were not more susceptible than fertile women to the effects of the exposure on pregnancy outcome. The theoretical benefit of the IVF/ET treatment to reduce this risk through careful embryo selection and increased number of embryos transferred was not observed. The results of this study bring to the clinical arena previous experimental observations that showed a significant decrease in the number of viable fetuses and an increase in the number of implantation failures in mice chronically exposed to air pollution (10).

The exact reason for the increased risk of miscarriage observed in women exposed to high levels of ambient PM₁₀ during the preconceptional period is not known. The disruption of the normal segregation pattern of the first two cell lineages, the inner cell mass (ICM) and trophoctoderm (TE), at the blastocyst stage as well as the loss of ICM morphological integrity have been documented in an experimental model used by our group for the evaluation of the effects of short-term exposure to DEP on fertilization and embryo development in vitro (personal communication). The size of first two cell lineages (ICM and TE) as well as their ratio influence future growth, viability, and implantation potential of the blastocyst. A positive relationship between cell number and morphology of the ICM and the rate of embryo implantation and post-implantation developmental potential were evidenced in experimental and clinical studies (1, 12, 26). Based on our experimental data and on these findings we could hypothesize that the lineage specification defect and the loss of ICM integrity may suggest one of the possible pathways through which increased risk of early pregnancy loss is observed in women exposed to high levels of ambient PM₁₀.

The current study benefited from the methodological and statistical approaches through which we controlled specific characteristics of study and control populations that could bias the observed effects by associations of exposure and outcome to confounding variables. The selection of pregnant patients in the control group with a regular menstrual cycle interval (~ 28-day cycle) and known LMP, confirmed by ultrasound, that were exposed to

ambient PM₁₀ during the same time-frame as case patients, with follicular phase duration precisely known, significantly reduced exposure misclassification despite the retrospective nature of the analysis. The high quality of the treatment and outcome data recovered was only possible because data were electronically recorded in a consistent manner during the study period, a feature of a private practice setting. To analyze properly the complex and interrelated nature of the IVF/ET treatment dependent variables, multiple logistic regression was selected as the statistical method to assess the effects of different ovarian response patterns to gonadotrophins, exposure and age ranges, and their interactions in this case-control study, eliminating the possibility of an observed effect be caused by chance (type I error).

However, we recognize some limitations of our study. Reproductive health is a couple-dependent process and even though we tried to minimize the male factor effect on the IVF/ET treatment outcome by selecting patients in which fertilization was achieved only by ICSI, the sperm DNA damage that may result from the exposure to intermittent air pollution could be also linked to the increased rate of adverse pregnancy outcome (4). Exposure assessment was limited since we used the ambient PM₁₀ levels derived from a network average across a number of sites in the city, an approach that could introduce some bias by not considering geographic microclimate differences in exposure (22). The selection of a single pollutant from a complex mixture of compounds present in air pollution to evaluate its effects on IVF/ET

treatment and pregnancy outcome may represent another important source of bias since some of the reported effects may be attributed to other pollutants. However, based on the results of our previous studies showing the effects of ambient particulate matter and DEP on fertilization and embryo development in vitro and on cell lineage segregation at the blastocyst stage, we focused our study on the evaluation of the possible effects of ambient PM₁₀ on reproductive health. Finally, extrapolation of the results to the general population may be limited by the fact that our population lived in areas of higher socioeconomic status and had the same ethnic origin, two important covariates that may influence and interact with environmental conditions (27, 28).

To our knowledge, this is the first study of its kind conducted to evaluate the possible effects of preconceptional short-term exposure to ambient PM₁₀ on treatment outcome of infertile women undergoing IVF/ET that live in a large metropolitan area. The results presented here provide evidence for a causal role of brief exposure to high levels of ambient PM₁₀ during the preconceptional period in early pregnancy loss, regardless of the method of conception. The 2.6-fold increase in the risk of early pregnancy loss during winter time has potential public health implications and warrants stronger environmental policies aimed to reduce urban air pollution during this period. Avoid conceiving during high-pollution alerts issued by environmental agencies would be a wise approach.

Acknowledgments

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

References

1. 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.
2. Tingen C, Stanford JB, Dunson DB. Methodologic and Statistical Approaches to Studying Human Fertility and Environmental Exposure. *Environ Health Perspect* 2004;112 87–93.
3. 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.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. Hansen C, Barnett A, Pritchard G. The effect of ambient air pollution during early pregnancy on fetal ultrasonic measurements during mid-pregnancy. *Environ Health Perspect* 2008;116:362–9.
8. 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.
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. 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.
11. 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

12. Kovacic B, Vlajsavljevic 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.
13. CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (São Paulo State Environmental Protection Agency). Poluentes do ar. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente do Governo do Estado de São Paulo, 2006. Available at: http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/ar_saude.asp.
14. 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;3:96-105.
15. Palermo G, Schlegel P, Colombero L, Zaninovic N, Moy F, Rosenwaks Z. Aggressive sperm immobilization prior to intracytoplasmic sperm injection with immature spermatozoa improves fertilization and pregnancy rates. *Hum Reprod* 1996;11:1023-9.
16. Veeck L. Preembryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. In: Veeck L, ed. *An Atlas of Human Gametes and Conceptuses: An Illustrated Reference for Assisted Reproductive Technology*. New York: The Parthenon Publishing Group, Inc., 1999:46-51.
17. 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.
18. 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.
19. Bell M, Ebisu K, Belanger K. Ambient air pollution and low birth weight in Connecticut and Massachusetts. *Environ Health Perspect* 2007;115:1118-25.
20. 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.
21. Selevan S, Kimmel C, Mendola P. Identifying critical windows of exposure for children's health. *Environ Health Perspect* 2000;108(Suppl 3):451-5.
22. Ritz B, Wilhelm M. Ambient air pollution and adverse birth outcomes: methodologic issues in an emerging field. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008;102:182-90.
23. 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.
24. 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.
25. Zinaman M, Clegg E, Brown C, O'Connor J, Selevan S. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril* 1996;65:503-9.
26. 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.

27. Morello-Frosch R, Pastor-Jr M, Porras C, Sadd J. Environmental justice and regional inequality in Southern California: implications for future research. *Environ Health Perspect* 2002;110(suppl 2):149–54.
28. Briggs D. Environmental pollution and the global burden of disease. *Br Med Bull* 2003;68:1-24.

Table 1. Ovarian response to superovulation according to particulate matter (PM₁₀) exposure period during follicular phase and age range in women undergoing IVF/ET

Response	< 35 yr ^a		≥ 35 yr ^b	
	Q ₁₋₃ Period	Q ₄ Period	Q ₁₋₃ Period	Q ₄ Period
Absent	7	2	13	5
Poor	49	19	83	34
Normal	55	23	42	12
High	29	9	13	5
Total	140	53	151	56

^a $\chi^2 = 0.564$, $p = 0.904$

^b $\chi^2 = 0.887$, $p = 0.828$

Table 2. Effects of follicular phase exposure to particulate matter (PM₁₀) levels during Q₁₋₃ and Q₄ periods on clinical and laboratory parameters, according to age range and ovarian response, in women undergoing IVF/ET. For explanation of the embryo development rate (EDR), see text.

Variable	< 35 yr						≥ 35 yr					
	Poor Response	Q ₁₋₃ Period Normal Response	High Response	Poor Response	Q ₄ Period Normal Response	High Response	Poor Response	Q ₁₋₃ Period Normal Response	High Response	Poor Response	Q ₄ Period Normal Response	High Response
Clinical Variables												
Stimulation (days)	9.9±1.9	10.0±1.4	9.5±0.9	9.2±1.6	10.7±2.4	10.2±1.0	10.0±1.6	10.0±1.3	10.1±1.3	10.2±1.9	9.4±1.7	10.4±0.9
Gonadotrophins (IU)	2,348±1,105	2,162±830	2,300±674	2,073±1,181	2,336±905	2,497±643	3,274±753	3,426±884	3,065±724	3,765±943	3,020±1,032	2,900±384
Endometrium (mm)	9.5±1.6	11.2±2.1	11.5±2.0	9.7±2.4	11.0±2.0	10.1±2.1	9.7±2.2	10.5±2.1	10.0±2.5	8.8±1.6	10.2±2.1	11.4±2.3
Peak E2 (pg / mL)	1,147±577	2,144±782	3,212±2,211	1,410±943	1,860±1,189	3,065±484	1,017±556	2,045±793	3,335±1,674	996±373	1,771±670	3,454±1,405
Laboratory Variables												
Day 0												
Follicles aspirated	12.1±7.3	19.7±6.5	31.0±8.1	12.2±4.1	18.3±3.9	31.8±10.2	8.1±3.6	17.1±5.5	30.0±12.4	8.7±5.6	14.6±3.8	31.8±5.6
Oocytes retrieved	7.2±2.4	13.5±3.5	24.1±4.5	6.7±1.7	13.6±2.6	22.3±5.7	5.7±2.2	12.7±2.7	20.7±2.2	5.2±2.2	10.9±1.6	23.2±4.5
MII oocytes rate	0.72±0.25	0.73±0.21	0.73±0.18	0.84±0.24	0.81±0.17	0.76±0.15	0.77±0.22	0.78±0.14	0.80±0.13	0.83±0.22	0.83±0.11	0.66±0.26
Day 1												
Fertilization rate	0.78±0.22	0.82±0.17	0.77±0.20	0.89±0.20	0.80±0.23	0.88±0.10	0.87±0.18	0.83±0.14	0.81±0.22	0.90±0.14	0.83±0.18	0.82±0.12
Day 2												
Cleavage rate	0.92±0.18	0.89±0.13	0.89±0.12	0.83±0.20	0.91±0.14	0.89±0.11	0.90±0.16	0.87±0.19	0.90±0.11	0.94±0.17	0.91±0.20	0.99±0.27
Good quality embryos rate	0.69±0.37	0.65±0.27	0.61±0.26	0.62±0.32	0.67±0.24	0.58±0.25	0.60±0.36	0.63±0.25	0.60±0.23	0.61±0.31	0.58±0.24	0.57±0.26
Day 3												
Cleavage rate	0.89±0.18	0.83±0.17	0.86±0.17	0.83±0.20	0.86±0.19	0.87±0.13	0.85±0.21	0.80±0.22	0.83±0.14	0.86±0.23	0.84±0.24	0.86±0.05
Good quality embryos rate	0.60±0.36	0.56±0.29	0.49±0.22	0.62±0.23	0.54±0.25	0.53±0.33	0.54±0.37	0.48±0.28	0.47±0.25	0.41±0.31	0.50±0.29	0.51±0.28
Transfer Variables												
Embryos transferred	2.4±1.1	3.3±1.1	2.6±0.8	2.9±1.1	3.4±0.8	3.4±1.2	2.6±1.1	3.7±1.2	3.7±0.8	2.5±1.1	3.3±1.0	3.6±0.9
EDR	6.9±1.6	7.4±1.1	7.5±1.2	6.5±1.7	7.6±0.9	7.7±0.4	6.8±1.5	7.0±1.3	7.7±0.6	6.7±1.6	7.2±1.1	8.0±0.8
Embryo quality score	2.6±1.0	2.0±0.9	2.0±1.0	2.7±0.9	1.9±1.0	1.8±1.0	2.4±1.0	2.4±0.8	2.2±0.9	2.7±1.0	2.3±0.9	2.2±1.3
Implanted embryos	0.9±1.0	1.1±1.0	0.8±0.9	1.1±1.1	1.0±1.0	1.6±1.2	0.5±0.8	0.5±0.7	0.5±0.5	0.4±0.6	0.8±1.1	0.4±0.5
Implantation rate	0.38±0.39	0.34±0.30	0.27±0.29	0.34±0.32	0.30±0.28	0.27±0.30	0.20±0.31	0.15±0.21	0.13±0.15	0.18±0.29	0.20±0.29	0.10±0.14

Values are means ± standard deviation.

Table 3. Effects of follicular phase exposure to particulate matter (PM₁₀) levels during Q₁₋₃ and Q₄ periods on IVF/ET treatment outcome, according to age range and ovarian response.

Outcome	< 35 yr						≥ 35 yr					
	Poor Response	Q ₁₋₃ Period Normal Response	High Response	Poor Response	Q ₄ Period Normal Response	High Response	Poor Response	Q ₁₋₃ Period Normal Response	High Response	Poor Response	Q ₄ Period Normal Response	High Response
Clinical pregnancy / cycle started (%)	27/49 (55%)	35/55 (64%)	14/29 (48%)	12/19 (63%)	15/23 (65%)	8/9 (90%)	26/83 (31%)	16/42 (38%)	6/13 (46%)	10/34 (29%)	6/12 (50%)	2/5 (40%)
Clinical pregnancy / embryo transfer (%)	27/46 (59%)	35/53 (66%)	14/28 (50%)	12/18 (67%)	15/23 (65%)	8/9 (90%)	26/71 (37%)	16/41 (39%)	6/13 (46%)	10/29 (34%)	6/12 (50%)	2/5 (40%)

Wald Z-value = 4.166; p = 0.000; odds ratio = 2.57; confidence interval: 1.65 – 4.01

Table 4. Pregnancy outcome according to particulate matter (PM₁₀) exposure period during follicular phase after natural or IVF conception

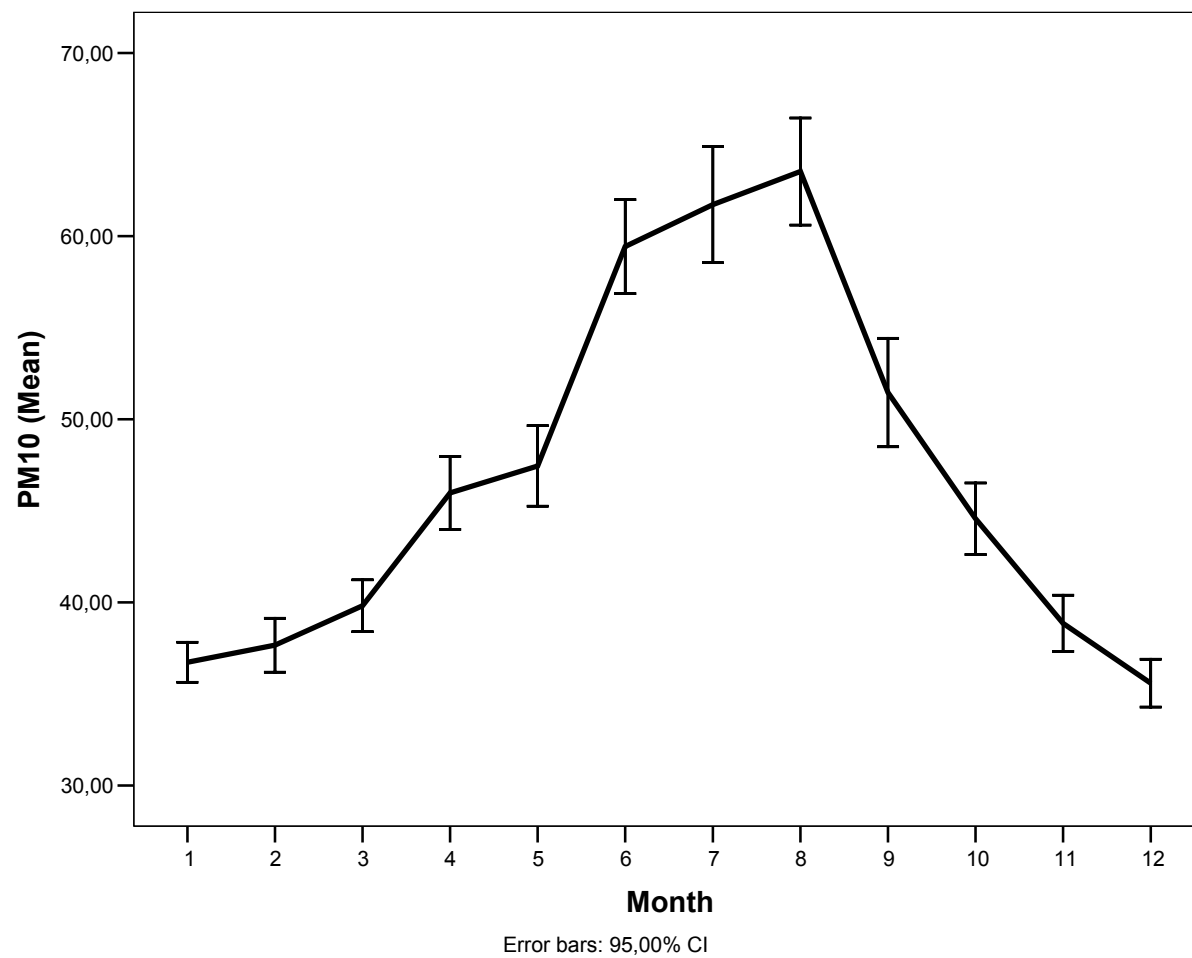
Conception	Pregnancy Outcome	Exposure			
		Q ₁₋₃ Period		Q ₄ Period	
		N	%	N	%
Natural	First trimester loss	34	13.7	32	30.2
	Term pregnancy	214	86.3	74	69.8
IVF	First trimester loss	18	14.5	15	28.3
	Term pregnancy	106	85.5	38	71.7

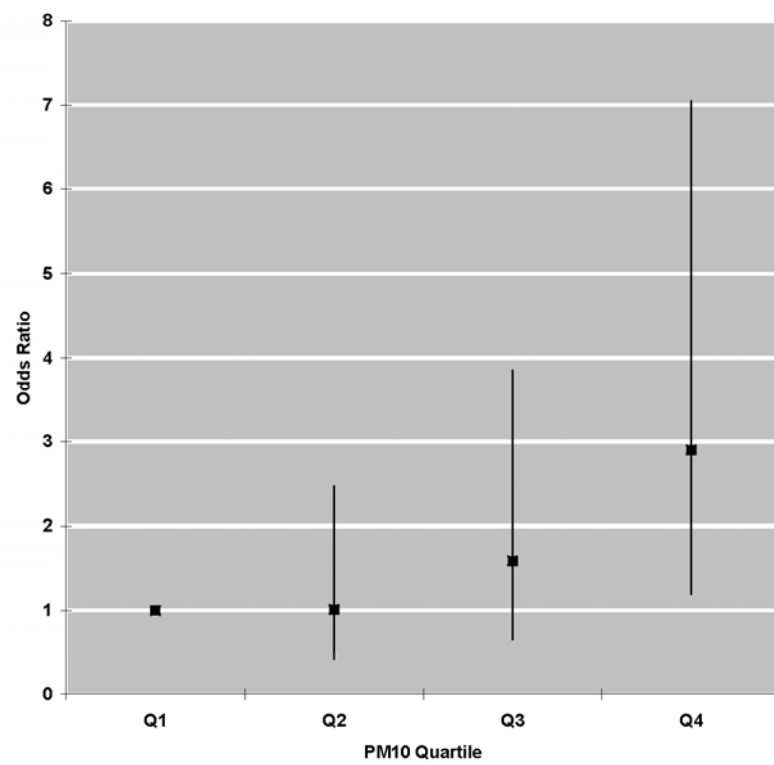
$\chi^2 = 16.75$; $p = 0.000$; odds ratio = 2.582

Illustrations

Figure 1. Monthly average and 95% confidence intervals of PM₁₀ concentrations ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) from 1997 to 2006 in the city of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Figure 2. Odds ratio and 95% confidence intervals for early pregnancy loss after natural or assisted conception according to interquartile range change of PM₁₀ ambient levels. The first quartile (Q₁) served as the reference group.





8. 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. Polosa R, Salvi S, DiMaria G. Allergic susceptibility associated with diesel exhaust particle exposure: clear as mud. *Arch Environ Health*. 2002;57(3):188-93.
5. Ono-Ogasawara M, Smith T. Diesel exhaust particles in the work environment and their analysis. *Ind Health*. 2004;42:389–99.
6. Inoue K, Takano H, Sakurai M, Oda T, Tamura H, Yanagisawa R, et al. Pulmonary exposure to diesel exhaust particles enhances coagulatory disturbance with endothelial damage and systemic inflammation related to lung inflammation. *Exp Biol Med*. 2006;231:1626–32.
7. Díaz-Robles L, Fu J, Reed G. Modeling and source apportionment of diesel particulate matter. *Environ Int*. 2008;34(1):1-11.
8. U.S. Environmental Protection Agency (EPA). Health assessment document for diesel engine exhaust. Prepared by the National Center for Environmental Assessment, Washington, DC, for the Office of Transportation and Air Quality [Internet]; 2002 [669 pages]. Available from: <http://www.epa.gov/ncea>.
9. Schuetzle D. Sampling of vehicle emissions for chemical analysis and biological testing. *Environ Health Perspect*. 1983;47:65-80.
10. Schuetzle D, Lewtas J. Bioassay-directed chemical analysis in environmental research. *Anal Chem*. 1986;58(11):1060A-75A.
11. Bayona J, Barcelo D, Albaiges J. Characterization of polar substituted polycyclic aromatic compounds using high-resolution gas chromatography/mass spectrometry negative ion chemical ionization and positive and negative ion thermospray liquid chromatography/mass spectrometry. *Biomed Environ Mass Spectrom*. 1988;16(1-12):461-7.
12. Vouk V, Piver W. Metallic elements in fossil fuel combustion products: amounts and form of emissions and evaluation of carcinogenicity and mutagenicity. *Environ Health Perspect*. 1983;47:201-25.
13. 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. *New Engl J Med*. 1993;329:329:1753-9.
14. Kinney P, Aggarwal M, Northridge M, Janssen N, Shepard P. Airborne concentrations of PM_{2.5} and diesel exhaust particles on Harlem sidewalks: A community-based pilot study. *Environ Health Perspect*. 2000;108:213-8.

15. Mauderly J. Diesel emissions: is more health research still needed? *Toxicol Sci.* 2001;62(1):6-9.
16. Nel A. Atmosphere. Air pollution-related illness: effects of particles. *Science.* 2005;308(5723):804-6.
17. Hansen C, Sheykhzade M, Møller P, Folkmann J, Amtorp O, Jonassen T, et al. Diesel exhaust particles induce endothelial dysfunction in apoE^{-/-} mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007;219(1):24-32.
18. Danielsen P, Risom L, Wallin H, Autrup H, Vogel U, Loft S, et al. DNA damage in rats after a single oral exposure to diesel exhaust particles. *Mutat Res.* 2008;637(1-2):49-55.
19. Kumagai Y, Koide S, Taguchi K, Endo A, Nakai Y, Yoshikawa T, et al. Oxidation of proximal protein sulfhydryls by phenanthraquinone, a component of diesel exhaust particles. *Chem Res Toxicol.* 2002;15(4):483-9.
20. Bayram H, Ito K, Issa R, Ito M, Sukkar M, Chung K. Regulation of human lung epithelial cell numbers by diesel exhaust particles. *Eur Respir J.* 2006;27(4):705-13.
21. Pan C, Schmitz D, Cho A, Froines J, Fukuto J. Inherent redox properties of diesel exhaust particles: catalysis of the generation of reactive oxygen species by biological reductants. *Toxicol Sci.* 2004;81:225-32.
22. Ohyama M, Otake T, Adachi S, Kobayashi T, Morinaga K. A comparison of the production of reactive oxygen species by suspended particulate matter and diesel exhaust particles with macrophages. *Inhal Toxicol.* 2007;19(Suppl 1):157-60.
23. Li N, Wang M, Oberley T, Sempf J, Nel A. Comparison of the prooxidative and proinflammatory effects of organic diesel exhaust particle chemicals in bronchial epithelial cells and macrophages. *J Immunol.* 2002;169(8):4531-41.
24. Xia T, Korge P, Weiss J, Li N, Venkatesen M, Sioutas C, et al. Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect.* 2004;112(14):1347-58.
25. Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, et al. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Health Perspect.* 2003;111(4):455-60.
26. Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Lunts A, et al. Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A.* 2002;65(20):1531-43.
27. Elder A, Oberdörster G. Translocation and effects of ultrafine particles outside of the lung. *Clin Occup Environ Med.* 2006;5(4):785-96.
28. Delfino R, Sioutas C, Malik S. Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ Health Perspect.* 2005;113:934-46.
29. Martins L, Pereira L, Lin C, Santos U, Prioli G, Luiz O, et al. The effects of air pollution on cardiovascular diseases: lag structures. *Rev Saúde Pública.* 2006;40(4):677-83.

30. McCreanor J, Cullinan P, Nieuwenhuijsen M, Stewart-Evans J, Malliarou E, Jarup L, et al. Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *N Engl J Med*. 2007;357:2348-58.
31. Furuta C, Suzuki A, Taneda S, Kamata K, Hayashi H, Mori Y, et al. Estrogenic Activities of Nitrophenols in Diesel Exhaust Particles. *Biol Reprod*. 2004;70:1527-33.
32. Furuta C, Noda S, Li C, Suzuki A, Taneda S, Watanabe G, et al. Nitrophenols isolated from diesel exhaust particles regulate steroidogenic gene expression and steroid synthesis in the human H295R adrenocortical cell line. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;229(1):109-20.
33. Proietti L, Spicuzza L, Polosa R. Urban air pollution at the crossroads of the allergic pandemic. *Ann Ital Med Int*. 2003;18(2):64-72.
34. 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.
35. Hesterberg T, Bunn W, McClellan R, Hart G, Lapin C. Carcinogenicity studies of diesel engine exhausts in laboratory animals: a review of past studies and a discussion of future research needs. *Crit Rev Toxicol*. 2005;35(5):379-411.
36. Ris C. U.S. EPA health assessment for diesel engine exhaust: a review. *Inhal Toxicol*. 2007;19(Suppl 1):229-39.
37. Wichmann H. Diesel exhaust particles. *Inhal Toxicol*. 2007;19(Suppl 1):241-4.
38. Yoshida S, Sagai M, Oshio S, Umeda T, Ihara T, Sugamata M, et al. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *Int J Androl*. 1999;22(5):307-15.
39. Watanabe N. Decreased number of sperms and Sertoli cells in mature rats exposed to diesel exhaust as fetuses. *Toxicol Lett*. 2005;155:51-8.
40. Oh S, Chung K. Identification of mammalian cell genotoxins in respirable diesel exhaust particles by bioassay-directed chemical analysis. *Toxicol Lett*. 2006;161:226-35.
41. Izawa H, Kohara M, Watanabe G, Taya K, Sagai M. Diesel exhaust particle toxicity on spermatogenesis in the mouse is aryl hydrocarbon receptor dependent. *J Reprod Dev*. 2007;53(5):1069-78.
42. Fujimoto A, Tsukue N, Watanabe M, Sugawara I, Yanagisawa R, Takano H, et al. Diesel exhaust affects immunological action in the placentas of mice. *Environ Toxicol*. 2005;20(4):431-40.
43. Reliene R, Hlavacova A, Mahadevan B, Baird W, Schiestl R. Diesel exhaust particles cause increased levels of DNA deletions after transplacental exposure in mice. *Mutat Res*. 2005;570(2):245-52.
44. 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.
45. Hougaard K, Jensen K, Nordly P, Taxvig C, Vogel U, Saber A, et al. Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice. *Part Fibre Toxicol*. 2008:doi:10.1186/743-8977-5-3.

46. Burczynski M, Penning T. Genotoxic polycyclic aromatic hydrocarbon ortho-quinones generated by aldo-keto reductases induce CYP1A1 via nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res.* 2000;60(4):908-15.
47. Solhaug A, Refsnes M, Lag M, Schwarze P, Husoy T, Holme J. Polycyclic aromatic hydrocarbons induce both apoptotic and anti-apoptotic signals in Hepa1c1c7 cells. *Carcinogenesis.* 2004;25(5):809-19.
48. Thomae T, Glover E, Bradfield C. A maternal Ahr null genotype sensitizes embryos to chemical teratogenesis. *J Biol Chem.* 2004;279(29):30189-94.
49. Nagy E, Adachi S, Takamura-Enya T, Zeisig M, Möller L. DNA adduct formation and oxidative stress from the carcinogenic urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone and its isomer 2-nitrobenzanthrone, in vitro and in vivo. *Mutagenesis.* 2007;22(2):135-45.
50. Tsukue N, Tsubone H, Suzuki A. Diesel exhaust affects the abnormal delivery in pregnant mice and the growth of their young. *Inhal Toxicol.* 2002;14(6):635-51.
51. Watanabe N, Kurita M. The masculinization of the fetus during pregnancy due to inhalation of diesel exhaust. *Environ Health Perspect.* 2001;109(2):111-9.
52. Yoshida S, Yoshida M, Sugawara I, Takeda K. Mice strain differences in effects of fetal exposure to diesel exhaust gas on male gonadal differentiation. *Environ Sci.* 2006;13(2):117-23.
53. Watanabe N, Ohsawa M. Elevated serum immunoglobulin E to *Cryptomeria japonica* pollen in rats exposed to diesel exhaust during fetal and neonatal periods. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2002;2(1):2.
54. Taneda S, Hayashi H, Sakushima A, Seki K, Suzuki A, Kamata K, et al. Estrogenic and anti-estrogenic activities of two types of diesel exhaust particles. *Toxicology.* 2002;170(1-2):153-61.
55. Taneda S, Mori Y, Kamata K, Hayashi H, Furuta C, Li C, et al. Estrogenic and anti-androgenic activity of nitrophenols in diesel exhaust particles (DEP). *Biol Pharm Bull.* 2004;27(6):835-7.
56. Mori Y, Taneda S, Hayashi H, Sakushima A, Kamata K, Suzuki A, et al. Estrogenic activities of chemicals in diesel exhaust particles. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(1):145-6.
57. Schantz S, Widholm J. Cognitive effects of endocrine-disrupting chemicals in animals. *Environ Health Perspect.* 2001;109(12):1197-206.
58. Takeda K, Tsukue N, Yoshida S. Endocrine-disrupting activity of chemicals in diesel exhaust and diesel exhaust particles. *Environ Sci.* 2004;11(1):33-45.
59. 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.
60. 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.
61. Harris C, Hansen J. In vitro methods for the study of mechanisms of developmental toxicology. In: Hood R, editor. *Developmental and*

- Reproductive Toxicology – A practical approach. 2nd ed. Florida: CRC Press; 2006. p. 647-95.
62. Suzuki O, Asano T, Yamamoto Y, Takano K, Koura M. Development in vitro of preimplantation embryos from 55 mouse strains. *Reprod Fertil.* 1996;8:975-80.
 63. Menezo Y. Mouse and bovine models for human IVF. *Reprod BioMed Online* 2002;4:170-5.
 64. Gardner D, Lane M. Embryo culture systems. In: Trounson A, Gardner D, editors. *Handbook of In Vitro Fertilization*. 2nd ed. Florida: CRC Press; 1999. p. 205-64.
 65. Biggers J. Thoughts on embryo culture conditions. *Reprod BioMed Online.* 2002;4(Suppl1):30-8.
 66. Goddard M, Pratt H. Control of events during early cleavage of the mouse embryo: an analysis of the 2-cell block. *J Embryol Exp Morphol.* 1983;73:111-33.
 67. Gardner D, Lane M. Alleviation of the 2-cell block and development to the blastocyst of CF1 mouse embryos: role of amino acids, EDTA and physical parameters. *Hum Reprod.* 1996;11:2703-12.
 68. Lawitts J, Biggers J. Joint effects of sodium chloride, glutamine, and glucose in mouse preimplantation embryo culture media. *Mol Reprod Dev.* 1992;31:189-94.
 69. Ho Y, Wigglesworth K, Eppig J, Schultz R. Preimplantation development of mouse embryos in KSOM: augmentation by amino acids and analysis of gene expression. *Mol Reprod Dev.* 1995;41:232-8.
 70. 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.
 71. Barnes F, Crombie A, Gardner D, Kausche A, Lacham-Kaplan O, Suikkari A, et al. Blastocyst development and birth after in-vitro maturation of human primary oocytes, intracytoplasmic sperm injection and assisted hatching. *Hum Reprod.* 1995;10:3243-7.
 72. Lane M, Gardner D. Ammonium induces aberrant blastocyst differentiation, metabolism, pH regulation, gene expression and subsequently alters fetal development in the mouse. *Biol Reprod.* 2003;69:1109-17.
 73. Biggers J, McGinnis L, Lawitts J. One-step versus two-step culture of mouse preimplantation embryos: is there a difference? *Hum Reprod.* 2005;20:3376-84.
 74. Gupta T, Demokritou P, Koutrakis P. Development and performance evaluation of a high-volume ultrafine particle concentrator for inhalation toxicological studies. *Inhal Toxicol.* 2004;16(13):851-62.
 75. Southam D, Dolovich M, O'Byrne P, Inman M. Distribution of intranasal instillations in mice: effects of volume, time, body position, and anesthesia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002;282(4):L833-9.
 76. Gardner D, Stevens J, Sheehan C, Schoolcraft W. Analysis of blastocyst morphology. In: Elder K, Cohen J, editors. *Human Preimplantation Embryo Selection*. London: Informa Healthcare; 2007. p. 79-87.
 77. Jaakkola J. Case-crossover design in air pollution epidemiology. *Eur Respir J.* 2003;21(Suppl. 40):81s-5.

78. 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(7):1184-98.
79. Sarnat J, Schwartz J, Catalano P, Suh H. Gaseous pollutants in particulate matter epidemiology: confounders or surrogates? *Environ Health Perspect.* 2001;109(10):1053-61.
80. 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.
81. CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (São Paulo State Environmental Protection Agency). Poluentes do ar. São Paulo: Secretaria de Estado do Meio Ambiente do Governo do Estado de São Paulo, 2006. Available at: http://www.cetesb.sp.gov.br/Ar/ar_saude.asp.
82. Jansen R. The effect of female age on the likelihood of a live birth from one in-vitro fertilisation treatment. *Med J Aust.* 2003;178(6):258-61.
83. Saldeen P, Källen K, Sundström P. The probability of successful IVF outcome after poor ovarian response. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2007;86(4):457-61.
84. 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.
85. Tingen C, Stanford JB, Dunson DB. Methodologic and Statistical Approaches to Studying Human Fertility and Environmental Exposure. *Environ Health Perspect.* 2004;112:87-93.
86. Sharara F, Seifer D, Flaws J. Environmental toxicants and female reproduction. *Fertil Steril.* 1998;70:613-22.
87. 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.
88. 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.
89. 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.
90. Hansen C, Barnett A, Pritchard G. The effect of ambient air pollution during early pregnancy on fetal ultrasonic measurements during mid-pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2008;116:362-9.
91. 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.
92. 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(1):70-7
93. Erbach G, Lawitts J, Papaioannou V, Biggers J. Differential growth of the mouse preimplantation embryo in chemically defined media. *Biol Reprod.* 1994;50:1027-33.
94. Summers M, Bhatnagar P, Lawitts J, Biggers J. Fertilization in vitro of mouse ova from inbred and outbred strains: complete preimplantation

- embryo development in glucose-supplemented KSOM. *Biol Reprod.* 1995;53:431-7.
95. Summers M, McGinnis L, Lawitts J, Biggers J. Mouse embryo development following IVF in media containing either L-glutamine or glycyl-L-glutamine. *Hum Reprod.* 2005;20:1364-71.
96. Xu J, Chan S, Lee W, Lee K, Yeung W. Differential growth, cell proliferation, and apoptosis of mouse embryo in various culture media and in coculture. *Mol Reprod Dev.* 2004;68:72-80.
97. Karagenc L, Lane M, Gardner D. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor stimulates mouse blastocyst inner cell mass development only when media lack human serum albumin. *Reprod BioMed Online.* 2005;10:511-8.
98. Iwasaki S, Yoshida N, Ushijima H, Watanabe S, Nakahara T. Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized *in vitro* and *in vivo*. *J Reprod Fertil.* 1990;90:279-84.
99. Leppens G, Gardner D, Sakkas D. 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.* 1996;11(3):598-603.
100. Summers M, Biggers J. Chemically defined media and the culture of mammalian preimplantation embryos: historical perspective and current issues. *Hum Reprod Update.* 2003;9(6):557-82.
101. Pool T. Recent advances in the production of viable human embryos *in vitro*. *Reprod BioMed Online.* 2002;4(3):294-302.
102. Gardner D, Lane M. Towards a single embryo transfer. *Reprod BioMed Online.* 2003;6:470-81.
103. Wang Y, Puscheck E, Lewis J, Trostinskaia A, Wang F, Rappolee D. Increases in phosphorylation of SAPK/JNK and p38MAPK correlate negatively with mouse embryo development after culture in different media. *Fertil Steril.* 2005;83(Suppl 1):1144-54.
104. Gardner D, Lane M. Amino acids and ammonium regulate mouse embryo development in culture. *Biol Reprod.* 1993;48:377-85.
105. Fong B, Watson P, Watson A. Mouse preimplantation embryo responses to culture medium osmolarity include increased expression of CCM2 and p38 MAPK activation. *BMC Dev Biol* 2007;7:2-17.
106. Hadi T, Hammer M, Algire C, Richards T, Baltz J. Similar effects of osmolarity, glucose, and phosphate on cleavage past the 2-cell stage in mouse embryos from outbred and F1 hybrid females. *Biol Reprod.* 2005;72:179-87.
107. Li N, Nel A. The cellular impacts of diesel exhaust particles: beyond inflammation and death. *Eur Respir J.* 2006;27(4):667-8.
108. Detmar J, Rabaglino T, Taniuchi Y, Oh J, Acton B, Benito A, et al. Embryonic loss due to exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons is mediated by Bax. *Apoptosis.* 2006;11(8):1413-25.
109. 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(6):687-94.

110. 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.
111. 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.
112. Bell M, Ebisu K, Belanger K. Ambient air pollution and low birth weight in Connecticut and Massachusetts. *Environ Health Perspect.* 2007;115:1118–25.
113. 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.
114. Selevan S, Kimmel C, Mendola P. Identifying critical windows of exposure for children's health. *Environ Health Perspect.* 2000;108(Suppl 3):451-5.
115. 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.
116. 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.
117. Zinaman M, Clegg E, Brown C, O'Connor J, Selevan S. Estimates of human fertility and pregnancy loss. *Fertil Steril.* 1996;65(3):503-9.
118. 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.
119. 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.
120. Morello-Frosch R, Pastor-Jr M, Porras C, Sadd J. Environmental justice and regional inequality in Southern California: implications for future research. *Environ Health Perspect.* 2002;110(suppl 2):149–54.
121. Briggs D. Environmental pollution and the global burden of disease. *Br Med Bull.* 2003;68:1-24.

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](#)