

Artigo de Revisão/Review Article

Poluição química e função ovárica Chemical pollution and ovarian function

Maria João Carvalho**, Francisco Falcão*, António Cabrita***, Isabel Torgal**, Carlos Freire-de-Oliveira**

ABSTRACT

The reproductive potential and health hazards of several environmental chemicals are a question of debate among scientific community and also general public. Steroidogenesis, meiotic maturation and intrafollicular process take part in the background of successful fertilization. The female reproductive health can be affected by endogenous and also exogenous factors. This review intends to present the available evidence about environmental chemicals and ovarian function.

Chemicals can affect ovarian function through direct effects on ovarian hormone production or by interference with hypothalamus/pituitary hormone action. Ovarian toxicants can provoke ovarian failure by extensive follicular destruction. This process leads to loss of ovarian steroid hormones and ovarian failure with increased levels of FSH and LH, suggesting premature menopause. To predict the reproductive impact of environmental agents, it is important to evaluate physiological consequences of a variety of mechanisms by which toxicants can disrupt ovarian function.

The exposures to agents from specific lifestyle habits (e.g. smoking) and environmental pollutants on the ovarian function have been studied either in vitro but mainly on animal models. Published data refer that exposure to some environmental agents may harbor risks considering reproductive behavior, infertility and ovarian failure. The harmful effects of cigarette smoke on reproduction were evaluated on various ways of the follicular processes. The influence of cigarette smoke on steroidogenesis and oocyte maturation are systematically described. Occupational chemicals, phthalates, hidrocarbonates halogenated and heavy metals influence ovarian processes and interfere with various mechanisms.

However, as most of the data available derive from laboratory species or in vitro models, the extrapolation to humans is still a question of debate.

Keywords: Ovarian function; pollution; chemicals

INTRODUÇÃO

O sistema reprodutivo feminino pode ser afectado por diversos factores endógenos e também exógenos, como exposição a agentes específicos do estilo de vida, poluentes ambientais e com propriedades de distorção endócrina ou mesmo metais pesados. Os estudos têm referido que a exposição a químicos pode

causar alterações na funcionalidade reprodutiva e contribuir para infertilidade e falência ovárica.

O efeito dos componentes do tabaco (cádmio, nicotina e cotinina) no microambiente folicular pode ter impacto negativo sobre a fertilidade feminina¹. Existem poluentes ambientais capazes de alterar o normal funcionamento endócrino em várias espécies. Exemplos deste mecanismo são os disruptores endócrinos

* Serviço de Ginecologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra

** Clínica Universitária de Ginecologia - Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

*** Instituto de Patologia Experimental - Faculdade de Medicina da Faculdade de Coimbra

como fenalatos e bifenol A². Estes agentes afectam o processo da esteroidogénese, expansão do complexo ovocitário e maturação meiótica¹. Cerca de 60 químicos foram identificados como disruptores endócrinos, particularmente organofosforados e poluentes orgânicos ambientais³. O impacto da exposição crónica a disruptores endócrinos através da ingestão de alimentos e água são alvos importantes de estudos de fertilidade em diversas espécies. A persistência destes agentes na matriz estromal ovárica e a capacidade de armazenamento no tecido adiposo permite a manutenção dos efeitos tóxicos⁴.

O conhecimento acerca dos mecanismos pelos quais os agentes químicos do ambiente provocam na foliculogénese está ainda por estabelecer, sendo um campo promissor de pesquisa. Os estudos disponíveis derivam de experiências *in vivo* com espécies laboratoriais ou modelos *in vitro*.

O ovário desempenha duas funções importantes, libertação de gâmetas femininas e produção de hormonas esteróides sexuais femininas. O tecido ovárico é dos mais dinâmicos e plásticos do organismo humano, desde a maturação folicular cíclica, ovulação e na ausência de gravidez a reabsorção do corpo amarelo⁵.

O ovário contém duas glândulas endócrinas: o folículo e o corpo amarelo. O folículo é responsável pela gametogénese (oogénese) e produção da hormona 17 β -estradiol (esteroidogénese). O corpo amarelo deriva do tecido folicular após a ovulação e produz progesterona, essencial para evolução da gravidez⁶.

Maturação ovocitária

Os ovócitos permanecem em profase da primeira meiose e apenas terminam a divisão meiótica em resposta a estímulos gonadotróficos pré-ovulatórios. A maturação ovocitária envolve a retoma da meiose, progredindo para metafase II e as alterações citoplasmáticas que preparam o ovócito para a fecundação⁷. Alguns mecanismos de regulação da maturação ovocitária ainda estão por estabelecer. Com o crescimento ovocitário no folículo préovulatório, os componentes envolvidos no ciclo celular acumulam-se de modo a permitir a meiose. A retoma da meiose ovocitária é prevenida por vias inibitórias derivadas de células somáticas adjacentes. Após o efeito das gonadotrofinas

pré-ovulatórias, o núcleo torna-se proeminente, desaparece após condensação cromossómica e dissolução da membrana nuclear. A meiose continua com a separação cromossómica, divisão assimétrica e extorsão do corpo polar. A segunda divisão fica suspensa em metafase II até à fertilização⁸. Altas concentrações de estradiol no fluido folicular são essenciais a este mecanismo de maturação ovocitária.

A maior causa de abortamento e defeitos congénitos são anomalias cromossómicas⁹. As aneuploidias derivam de erros meióticos, sendo importante identificar factores que aumentem a não-disjunção meiótica. Dos factores de risco associados pode incluir-se: irradiação, tabaco, contraceptivos orais e poluentes ambientais¹.

Esteroidogénese

O ovário sintetiza um número significativo de hormonas esteróides, sobretudo estrogénios e progesterona, que, como sobejamente conhecido, desempenham funções relevantes no desenvolvimento sexual feminino, gravidez e comportamento, assim como efeitos no próprio ovário.

No ovário, a LH estimula a captação de colesterol LDL (*low-density lipoprotein*) através do cAMP, que é transportado até à membrana interna da mitocôndria por proteínas reguladoras da esteroidogénese (10). As enzimas mitocondriais do complexo CYP11A1 catalizam a primeira etapa da via metabólica, o colesterol é clivado e convertido a pregnanolona¹. O RNAm CYP11A1 expresso primariamente pelas células da teca interna e a sua expressão aumenta no corpo amarelo¹¹. Os precursores 3 β -hidroxiesteróide são oxidados e isomerizados em 3-cetoesteróides pela 3 β -hidroxiesteróides desidrogenase¹². A próxima enzima na síntese esteróide é a CYP 17 (esteróide-17 α hidroxilase) que catalisa a 17-pregnenolona e progesterona e apresenta actividade 17, 20-liase para produzir androstenediona e dihidroepiandosterona¹². Esta última enzima é apenas detectada na teca interna e especula-se a sua ausência nas células da granulosa¹. Em resposta à LH, a androstenediona sintetizada pelas células da teca difunde-se para células da granulosa onde, após estimulação pela FSH, verifica-se aromatização (CYP19) de androgénios em estrona e posteriormente estradiol. Este mecanismo paten-

teia a teoria de “duas células, duas gonadotrofinas”¹³. A expressão do RNAm do gene CYP19 nos folículos maduros é consistente com o aumento da síntese de estrogénio antes da ovulação¹⁴.

Efeito dos tóxicos sobre o ovário

A função do aparelho reprodutivo feminino pode ser comprometida pela exposição a químicos tóxicos em diversos locais, incluindo glândula pituitária, ovário e tracto genital feminino. A forma como os diversos agentes afectam a função ovárica não está claramente estabelecida, mas podem estar implicados um ou vários mecanismos.

O efeito sobre o ovário pode causar falência ovárica, com elevação dos níveis de FSH por perda do retrocontrolo negativo dos estrogénios ováricos.

O efeito indirecto na função ovárica pode resultar de alterações na libertação hipofisária de gonadotrofinas (FSH e LH), acarretando interrupção do retrocontrolo sobre estrogénios e progesterona. Por outro lado, os agentes tóxicos reprodutivos podem influenciar directamente a produção de hormonas esteróides, maturação ovocitária e manutenção da gravidez¹⁵.

O efeito do tabaco sobre a fertilidade feminina tem sido abordado em diversos estudos, sendo consensual o seu impacto adverso. Os processos intrafoliculares são afectados pelos componentes do tabaco, explicando em parte este efeito negativo. Considerando o cádmio, alcalóides do tabaco, nicotina e seus metabolitos, são os componentes mais estudados e o seu impacto no aparelho genital feminino.

Recentemente diversos poluentes ambientais foram estudados no contexto da fisiologia do aparelho reprodutivo, sendo as conclusões genericamente consonantes com alterações no sistema reprodutivo feminino^{16,17}. Alguns destes disruptores endócrinos são insecticidas, herbicidas, fetalatos, bisfenol A, alquilfenóis, bifenóis policlorados e dioxinas. Muitos destes disruptores endócrinos caracterizam-se por um efeito estrogénio-*like* e estes agentes têm também sido conotados como responsáveis por um grande número de disfunção sexual em animais selvagens^{18,19}. Alguns destes componentes foram já identificados no soro e também no líquido folicular, podendo deste modo afectar adversamente os processos foliculares^{20,21,22}.

Um estudo com ratos fêmea tratadas com químicos ocupacionais durante 30 dias, mostrou uma perda ovocitária de 90% após 30 dias de exposição. No entanto os níveis de FSH só aumentaram ao final de 240 dias²³. Assim se demonstra que as alterações ováricas precedem o aumento de FSH, sendo o efeito sobre o ovário provocado pela depleção de pequenos folículos pré-antrais.

O efeito directo que os tóxicos desempenham sobre os folículos ováricos depende da fase de desenvolvimento em que os folículos são destruídos, o que determina o impacto reprodutivo²⁴. Os químicos que afectam selectivamente os folículos antrais, têm um impacto temporário sobre a fertilidade, uma vez que podem ser substituídos pelos folículos posteriormente recrutados dos numerosos folículos primordiais². Estes agentes provocam amenorreias cíclicas, reversíveis a curto prazo após a exposição. Por outro lado os químicos que destroem os ovócitos dos folículos primordiais causam infertilidade permanente e falência ovárica precoce, uma vez que os folículos primordiais não podem ser repostos²³.

Deve também ser considerada a fase da vida da mulher em que ocorre a exposição aos agentes tóxicos reprodutivos. Caso se verifique na infância, pode atrasar ou acelerar a puberdade, à custa do efeito mimético estrogénico. Os químicos podem alterar a função reprodutiva a nível neuroendócrino ou selectivamente sobre os ovócitos numa fase avançada do seu desenvolvimento, deste modo constata-se um efeito reversível². Em casos mais dramáticos pode ocorrer destruição de células germinativas antes da puberdade ou durante o desenvolvimento fetal, impedindo o desenvolvimento dos sistemas envolvidos na fertilidade. O efeito dos tóxicos na pós-menopausa é um tema por estabelecer, uma vez não sendo possível afectar a capacidade reprodutiva, especulam-se as implicações no cancro do ovário. Por outro lado a explicação para o aumento de incidência de cancro do ovário na prémenopausa pode ser justificado pela exposição a tóxicos ambientais.

Mecanismos de toxicidade ovárica

Os mecanismos intracelulares de toxicidade ovárica assentam sobretudo no estágio de maturação e

evolução da morfologia nuclear. A maturação citoplasmática é difícil de avaliar, sendo um parâmetro muito importante da maturação folicular. A maturação folicular é caracterizada por rearranjos espaciais e ultraestruturais, assim como reacções químicas e moleculares^{25,26}. Alguns estudos experimentais com ovócitos bovinos tentaram determinar os efeitos deletérios de químicos sobre a maturação nuclear, desenvolvimento embrionário e aspectos da maturação citoplasmática, como modulação do RNAm, migração e exocitose de grânulos corticais^{27,28}.

Alterações do armazenamento de RNAm citoplasmático

A síntese de RNAm e proteínas durante o crescimento ovocitário e maturação contribui para o desenvolvimento precoce. O RNAm é armazenado durante o crescimento ovocitário tendo sido identificados pontos chave da regulação transcripcional, determinação da sua estabilidade e processos iniciais do desenvolvimento embrionário precoce²⁷. Alguns tóxicos estudados da família dos organoclorados produzem adenição de alguns dos genes, reflectindo a perturbação dos contaminantes na regulação da tradução.

Alteração da redistribuição dos grânulos corticais

A migração e distribuição dos grânulos são um atributo da maturação citoplasmática, incluindo a orientação temporal com os estádios de desenvolvimento nuclear. A exposição a alguns químicos ambientais provoca atraso na migração e dispersão dos grânulos corticais, indicando alteração da maturação citoplasmática. Uma percentagem significativa dos ovócitos fertilizados não liberta grânulos corticais após penetração do espermatozóide, facto também presente em fertilização múltipla com técnicas in-vitro²⁹. Os organoclorados bloqueiam as vias moleculares que estimulam a exocitose de grânulos corticais e consequentemente provocam poliplóidias uma vez que não provocam bloqueio da poliesperma.

A produção de esteróides pelas células da granulosa é outro mecanismo implicado, reduzindo a secreção de estradiol e aumentando a apoptose. As dioxinas policloradas dos pesticidas podem alterar

a permeabilidade da membrana celular e a secreção esteróide³⁰. Estas dioxinas mostraram desregular os receptores de FSH nas células da granulosa de ratos em concentrações ambientais reduzidas³¹. Dados recentes de estudos animais com porcos, mostraram redução da secreção ovocitária de estradiol e progesterona quando expostos a dioxinas, sendo este efeito dose-dependente³¹.

Diversos estudos animais são consistentes com a demonstração da actividade de tóxicos, concretamente da família dos organoclorados, na destruição ovocitária consequente da desregulação da maturação citoplasmática.

AGENTES DE TOXICIDADE OVÁRICA

Os químicos que destroem os folículos primordiais e primários podem causar infertilidade irreversível e consequentemente menopausa precoce. Esta lesão não é detectada até que o recrutamento folicular não pode mais ser conseguido²³.

Tabaco

Esteroidogénese

O tabaco tem potencial de submeter o organismo a tóxicos. Os sujeitos inalam Cádmiu que se acumula em diversos órgãos, incluindo nos ovários e é detectado no líquido folicular em elevadas concentrações em fumadores³⁸. Este elemento provoca genericamente dois tipos de efeitos na esteroidogénese. Em baixas doses estimula a transcrição do gene P450scc e activa a esteroidogénese ovárica³⁹. Por outro lado em concentrações elevadas inibe o gene P450scc, a síntese de progesterona e induz alterações na morfologia celular e consequente morte celular^{39,40}. As alterações induzidas pelo cádmio na expressão do gene P450 das células da granulosa afectam a síntese de todas as hormonas esteróides do ovário⁴¹.

Os alcalóides da nicotina são rapidamente absorvidos do tabaco através do tracto respiratório. A cotinina é o metabolito principal da nicotina e dada a sua semi-vida longa, é um marcador de exposição recente¹. Este metabolito foi detectado no líquido folicular de mulheres submetidas a técnicas de reprodução medicamente assistida³⁸. Os estudos sobre o efeito do

tabaco sobre a fisiologia das células da granulosa e luteínicas humanas são ainda contraditórios. Os estudos *in vitro* mostraram inibição da aromatase das células da granulosa⁴². Outro estudo demonstrou que nem a nicotina nem a cotinina alteram a secreção de progesterona e estradiol pelas células da granulosa, de acordo com doseamentos séricos⁴³. Parece portanto, que parte do efeito da nicotina e seus metabolitos na síntese de esteróides, não será directa. Num trabalho mais recente, constatou-se que a nicotina afecta negativamente a esteroidogénese luteal basal, mas não afecta a libertação de progesterona induzida pela hCG⁴⁴. Verificou-se um aumento da prostaglandina F₂, com efeito luteolítico e pelo contrário, inibição da libertação de prostaglandina E₂, com efeito luteotrófico. A nicotina afecta também a expressão de RNAm do factor de crescimento do endotélio vascular (*VEGFvascular endothelial growth factor*), que reconhecidamente influencia a fisiologia luteal⁴⁴.

Outro mecanismo indirecto descrito refere-se à inibição da síntese de progesterona pelos alcalóides do tabaco através da inibição do crescimento e morte celular das células sintetizadoras de esteróides⁴⁵.

Maturação Ovocitária

Existem relatos claros da influência do tabaco sobre a meiose ovocitária e consequentes erros cromossómicos que afectam a fertilidade³⁸. Em estudos animais foi descrito, há 2 décadas, um aumento de anomalias cromossómicas (diploidias e aploidias) em ovócitos isolados após exposição ao cádmio¹. Em trabalhos posteriores, não foi descrito qualquer efeito da nicotina na maturação meiótica em doses inferiores a 5mM. No entanto a exposição dos ovócitos a doses superiores mostrou marcadas alterações na primeira e também segunda divisão meiótica, resultando em aberrações da configuração da cromatina⁴⁶. Estima-se que nos humanos expostos à nicotina, a dose à qual os ovócitos estão sujeitos não ultrapassa 1mM, portanto o efeito da nicotina sobre ovócitos dificilmente será causa de infertilidade⁴⁶. Em doentes submetidas a técnicas de reprodução medicamente assistida, verificou-se uma significativa redução do número de ovócitos obtidos em senhoras expostas a tabaco⁴⁷. A maturação ovocitária é interrompida na 1ª meiose, o período mais sensível de dano genético⁴⁶.

Como componente importante do tabaco, os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos têm toxicidade reprodutiva bem estabelecida^{48,49}. Muitos estudos com ratos demonstraram a destruição de pequenos folículos quando expostos a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos⁵⁰. A exposição diária durante a gravidez causou esterilidade completa nas fêmeas geradas e diminuição do tamanho e número de folículos da rata progenitora⁵¹.

Químicos ocupacionais

O 1,3Butadieno e químicos relacionados são libertados pela indústria da borracha, resinas e também tabaco e combustíveis automóveis². Um estudo animal com ratos fêmea produziu uma depleção de 98% de folículos primordiais, comprovando o efeito tóxico ovárico destes metabolitos⁵².

A família do 4-vinilciclohexeno, produzido pela dimerização do butadieno, são químicos derivados da indústria da borracha, plásticos e pesticidas. A exposição de ratos fêmea a estes agentes provocou destruição selectiva de folículos primitivos e primordiais^{53,54}.

Estes agentes contribuem para uma depleção de folículos primordiais e deste modo parecem contribuir para uma menopausa precoce.

Fetalatos

Trata-se de um grupo de químicos amplamente utilizado na produção de plásticos, embalagens de alimentos e medicamentos⁵⁵. Um estudo com ratos fêmea demonstrou que a exposição oral repetida causava atraso na ovulação, redução do tamanho das células da granulosa no folículo antral, diminuição de estrogénios e progesterona, níveis de LH e aumento FSH⁵⁵. Estudos *in vitro* com metabolitos activos mostraram inibição da aromatase nas células da granulosa colhidas do antro folicular⁵⁶. O mecanismo envolvido será a activação dos receptores dos peroxissomas⁵⁷. Parece portanto que estes agentes apresentam uma acção selectiva sobre os folículos pré-ovulatórios, prejudicando a ovulação.

Hidrocarbonetos halogenados

São disruptores endócrinos com efeito estrogénico e anti-estrogénico, com capacidade de influenciar o

desenvolvimento dos alvos hormonais, incluindo receptores estrogénicos uterinos². Estão presentes nos compostos de fertilização e pesticidas agrícolas e na indústria química. O pesticida tetraclorodibenzo-p-dioxina demonstrou capacidade de reduzir taxas de ovulação⁵⁸. Estes agentes podem actuar quer a nível hipotálamo/hipófise e também ovárico. O efeito transplacentar desta família de tóxicos prejudica o desenvolvimento ovárico de crias de ratos fêmea (59). A exposição em idade gestacional precoce (13 dias) provocou uma perda folicular de 40-50%, independentemente da etapa do desenvolvimento folicular. No entanto esta redução de folículos não provocou alterações reprodutivas durante o período testado de 5 meses.

A alteração endócrino directa pode afectar a capacidade reprodutiva à custa dos mecanismos descritos e porventura outros não estabelecidos. No entanto reconhece-se também o efeito ovárico directo.

Metais pesados

Apesar de pouco estudado o efeito reprodutivo, são uma classe de contaminantes ambientais com potenciais efeitos deletérios. Os estudos animais e também epidemiológicos mostraram uma capacidade clara de alterar a função ovárica, concretamente considerando o cádmio, chumbo e mercúrio².

Cádmio

Este elemento tem sido largamente reportado no contexto dos efeitos ováricos. A exposição ambiental nos humanos pode ser devida ao tabaco, alimentos, processamento da indústria e ecossistemas terrestres e aquáticos (38, 60). A acumulação de cádmio no ovário induz necrose das células ováricas⁶¹. Também foi descrito o impacto na esteroidogénese, confirmado por estudos *in vitro*⁶² e já pormenorizado em secção anterior. Este agente induz efeitos envolvendo a função ovárica e também regulação neuro-endócrina.

Chumbo

O chumbo é ubíquo no ambiente. As maiores fontes de exposição são produtos comerciais como tinta, gasolina, material de impressão e baterias ácidas⁶³. Foram descritos efeitos directos ováricos nos ratos que causam disfunção da foliculogénese, incluindo

menor número de folículos primordiais e atresia dos folículos antrais⁶⁴. A exposição transplacentar resulta na redução de folículos primordiais em animais de laboratório, no entanto parece existir um efeito acessório sobre o hipotálamo/hipófise e esteroidogénese ovárica⁶³.

Mercúrio

Os combustíveis fósseis, fertilizantes agrícolas e indústria são fonte de poluição de mercúrio no ambiente. Os organomercuriais podem ser absorvidos pelo tracto gastro-intestinal pelo consumo de peixe contaminado. O cloreto de mercúrio demonstrou alteração dos ciclos estros em ratos e causou anovulação em murganhos⁶⁵. Os estudos animais não estabeleceram ainda mecanismos exactos acerca do compromisso da função ovárica e sobre o eixo hipotálamo/hipófise-ovário.

CONCLUSÕES

A exposição a factores ambientais parece contribuir de forma considerável para um impacto reprodutivo negativo. Os tóxicos absorvidos podem ter consequências nos processos foliculares, concretamente produção de hormonas esteróides e maturação oocitária. Os mecanismos responsáveis pelo efeito deletério sobre a fisiologia do ovário estão em grande parte por estabelecer. Os estudos actuais derivam de experiências com animais de laboratório e modelos *in vitro*, não sendo possível extrapolar directamente para a espécie humana. A falta de informação sobre o metabolismo e biodistribuição dos químicos, que dependem da espécie, concentração e duração da exposição, assim como interações entre os componentes ambientais, podem influenciar grandemente as conclusões dos estudos.

A investigação sobre os mecanismos específicos de toxicidade e o metabolismo dos tóxicos são campos de investigação futura. A lista dos químicos ambientais que podem perturbar o normal funcionamento reprodutivo está ainda escassamente preenchida. Assim, seria importante identificar biomarcadores que estimem o risco de desenvolvimento de toxicidade reprodutiva.

BIBLIOGRAFIA

1. Mlynarcikova A, Fickova M, Sesusukova S. Ovarian intrafollicular processes as a targeted for cigarette smoke components and selected environmental reproductive disruptors. *Endoc reg.* 2005;**39**:20-31.
2. Hoyer P Damage to ovarian development and function. *Cell Tissue Res* 2005;**322**: 99–106.
3. Pocar P, Brevini T, Fischer B, Gandolfi F. The impact of endocrine disruptors on oocyte competence, *Reproduction* 2003;**125**:313–325
4. Hirshfield, A. Development of follicles in the mammalian ovary. *Int Rev Cytol.* 1991;**124**:43–101
5. Tsafiriri, A, Chun S, Reich R. Follicular rupture and ovulation. In: *The Ovary* (Ed. EY Adashi and CK Leung), pp. 227-244, Raven Press, New York 1993.
6. Gandolfi F, Pocar P, Brevini T, Fischer B: Impact of endocrine disruptors on ovarian function and embryonic development. *Domest Anim Endocrinol.* 2002;**23**:189-201.
7. Hyttel P, Callesen H, Greve T. Ultrastructural features of preovulatory oocyte maturation in superovulated cattle. *J Reprod Fertil.* 1986;**76**:645-656.
8. Hyttel P, Greve T, Callesen H: Ultrastructural aspects of oocyte maturation and fertilization in cattle. *J Reprod Fertil Suppl.* 1989;**38**:35-47.
9. Hassold T, Hunt P. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet.* 2001;**2**:280-291.
10. Brannian J, Shiigi S, Stouffer R. Gonadotropin surge increases fluorescent-tagged lowdensity lipoprotein uptake by macaque granulosa cells from preovulatory follicles. *Biol Reprod.* 1992;**47**:355-360.
11. Goldring N, Durica J, Lifka J, Hedin L, Ratoosh S, Miller W, Orly J, Richards J. Cholesterol side-chain cleavage P450 messenger ribonucleic acid: evidence for hormonal regulation in rat ovarian follicles and constitutive expression in corpora lutea. *Endocrinology.* 1987;**120**:1942-1950.
12. Lorence M, Corbin C, Kamimuran N, Mahendroo M, Mason J. Structural analysis of the gene encoding human 3 betahydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-4-isomerase. *Mol Endocrinol.* 1990;**4**:1850-1855.
13. Fowler R, Fox N, Edwards R, Steptoe P: Steroid production from 17alpha-hydroxypregnenolone and dehydroepiandrosterone by human granulosa cells in vitro. *J Reprod Fertil* 54, 109-117, 1978.
14. Steinkampf M, Mendelson C, Simpson E. Regulation by follicle-stimulating hormone of the synthesis of aromatase cytochrome P-450 in human granulosa cells. *Mol Endocrinol.* 1987;**1**:465-471.
15. Gandolfi F, Pocar P, Brevini T, Fisher B: Impact of endocrine disruptors on ovarian function and embryonic development. *Domest Anim Endocrinol* 23, 189-201, 2002.
16. Sumpter J. Xenoendocrine disrupters – environmental impacts. *Toxicol Lett.* 1998;**102-103**:337-342.
17. Toppari J, Larsen JC, Christiansen P et al. (1996) Male reproductive health and environmental xenoestrogens *Environmental Health Perspectives*, 104 Supplement 4 741–803.
18. Colborn T, vom Saal F and Soto A. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans *Environmental Health Perspectives.* 1993;**101**:378–384.
19. Facemire C, Gross T, GuilletteL. Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture? *Environ Health Perspect* 103 Suppl. 1995;**4**:79-86.
20. Jarrell J, Bodo L, YoungLai E, Barr R and O'Connell G. The short-term reproductive toxicity of cyclophosphamide in the female rat *Reproductive Toxicology.* 1991;**5**:481–485.
21. Ikezuki Y, Tsutsumi O, Takai Y, Kamei Y, Taketani Y: Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Hum Reprod.* 2002;**17**:2839-2841.
22. Latini G, De Felice C, Presta G, Del Vecchio A, Paris I, Ruggieri F, Mazzeo P. In utero exposure to di-(2-ethylhexyl)phthalate and duration of human pregnancy. *Environ Health Perspect.* 2003;**111**:1783-1785.
23. Hooser SB, Douds DP, DeMerrell DG, Hoyer PB, Sipes IG. Long-term ovarian and gonadotropin changes in mice exposed to 4-vinylcyclohexene. *Reprod Toxicol.* 1994;**8**:315–323.
24. Hoyer P, Sipes I. Assessment of follicle destruction in chemical-induced ovarian toxicity *Annual Review of Pharmacology and Toxicology.* 1996;**36**:307–331.
25. Hyttel P, Fair T, Callesen H and Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle *Theriogenology.* 1997;**47**:23–32
26. Brevini-Gandolfi T, Gandolfi F. The maternal legacy to the embryo: cytoplasmic components and their effects on early development. *Theriogenology.* 2001;**55**:1255–1276.
27. Brevini-Gandolfi TA, Favetta LA, Mauri L, Luciano AM, Cillo F and Gandolfi F. Changes in poly(A) tail length of maternal transcripts during in vitro maturation of bovine oocytes and their relation with developmental competence. *Molecular Reproduction and Development.* 1999;**52**:427–433.
28. Damiani P, Fissore R, Cibelli J, Long C, Balise J, Robl J, Duby R. Evaluation of developmental competence, nuclear and ooplasmic maturation of calf oocytes. *Molecular Reproduction and Development.* 1996;**45**:521–534.
29. Pocar P, Perazzoli F, Luciano A, Gandolfi F. In vitro reproductive toxicity of polychlorinated biphenyls: effects on oocyte maturation and developmental competence in cattle. *Molecular Reproduction and Development.* 2001;**58**:411–416.
30. Heimler I, Rawlins R, Owen H, Hutz R. Dioxin perturbs, in a dose- and time-dependent fashion, steroid secretion, and induces apoptosis of human luteinized granulosa cells. *Endocrinology.* 1998;**139**:4373–4379.
31. Hirakawa T, Minegishi T, Abe K, Kishi H, Inoue K, Ibuki Y and Miyamoto K. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the expression of follicle-stimulating hormone receptors during cell differentiation in cultured granulosa cells. *Endocrinology.* 2002;**141**:1470–1476.
32. Warne G, Fairley K, Hobbs J, Martin F. Cyclophosphamide-induced ovarian failure. *N Engl J Med.* 1973;**289**:1159–1162.
33. Huong L du, Amoura Z, Duhuat P, Sbai A, Costedoat N, Wechsler B, Piette JC. Risk of ovarian failure and fertility after intravenous cyclophosphamide: a study in 84 patients. *J Rheumatol.* 2002;**29**:2571–2576.
34. Plowchalk D, Mattison D. Phosphoramidate mustard is responsible for the ovarian toxicity of cyclophosphamide. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991;**107**:472–481.
35. Plowchalk D, Mattison D. Reproductive toxicity of cyclophosphamide in the C57BL/6N mouse. 1. Effects on ovarian structure and function. *Reprod Toxicol.* 1992;**6**:411–421.
36. Meiorow D, Lewis H, Nugent D, Epstein M. Subclinical depletion of primordial follicular reserve in mice treated with cyclophosphamide: clinical importance and proposed accurate investigative tool. *Hum Reprod.* 1999;**14**:1903–1907.
37. Mattison D, Shiromizu K, Nightingale M. Oocyte destruction by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Am J Ind Med.* 1993;**4**:191–202.
38. Zenkes M, Krishnan S, Krishnan B, Zhang H, Casper R. Cadmium accumulation in follicular fluid of women in in vitro fertilization-embryo transfer is higher in smokers. *Fertil Steril.* 1995;**64**:599-603.
39. Smida A, Valderrama X, Agostini M, Furlan M, Chedrese J. Cadmium stimulates transcription of the cytochrome p450 side chain cleavage

- gene in genetically modified stable porcine granulosa cells. *Biol Reprod*. 2004;70:25-31.
40. Massany I, Bardos L, Opper K, Hluchy S, Kovacic J, Csicsai G, Toman R. Distribution of cadmium in selected organs of mice: effects of cadmium on organ contents of retinoids and beta-carotene. *Acta Physiol Hung*. 1999;86:99-104.
 41. Henson M, Chedrese P. Endocrine disruption by cadmium, a common environmental toxicant with paradoxical effects on reproduction. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004;229:383-392.
 42. Barbieri R, Mcshne P, Ryan K. Constituents of cigarette smoke inhibit human granulosa cell aromatase. *Fertil Steril*. 1986;46:232-236.
 43. Weiss T, Eckert A: Cotinine levels in follicular fluid and serum of IVF patients: effect on granulosa-luteal cell function in vitro. *Hum Reprod*. 1989;4:482-485.
 44. Micelli F, Minici F, Tropea A, Catino S, Orlando M, Lamanna G, Sagnella F, Tiveri F, Bompiani A, Mancuso S, Lanzone A, Effects of Nicotine on Human Luteal Cells In Vitro: A Possible Role on Reproductive Outcome for Smoking Women. *Biol Reprod* 2004;34(234-242)
 45. Gocze P, Freeman D. Cytotoxic effects of cigarette smoke alkaloids inhibit the progesterone production and cell growth of cultured MA-10 Leydig tumor cells. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2000;93:77-83
 46. Racowsky C, Kaufman M. Nuclear degeneration and meiotic aberrations observed in human oocytes matured in vitro: analysis by light microscopy. *Fertil Steril*. 1992;58:750-755.
 47. Van Voorhis B, Dawson J, Stovall D, Sparks A, Syrop C. The effects of smoking on ovarian function and fertility during assisted reproduction cycles. *Obstet Gynecol*. 1996;88:785-791.
 48. Baird DD, Wilcox AJ . Cigarette smoking associated with delayed conception. *JAMA*. 1985;253:2979-2983.
 49. Weinberg CR, Wilcox AJ, Baird DD. Reduced fecundability in women with prenatal exposure to cigarette smoking. *Am J Epidemiol*. 1989;129:1072-1078.
 50. Borman S, Christian P, Sipes I, Hoyer P. Ovotoxicity in female Fischer rats and B6 mice induced by low-dose exposure to three polycyclic aromatic hydrocarbons: comparison through calculation of an ovotoxic index. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000;167:191-198.
 51. MacKenzie K, Angevine D. Infertility in mice exposed in utero to benzo(a)pyrene. *Biol Reprod*. 1981;24:183-191.
 52. Doerr J, Hooser S, Smith B, Sipes I. Ovarian toxicity of 4-vinylcyclohexene and related olefins in B6C3F1 mice: role of diepoxides. *Chem Res Toxicol*. 1995;8:963-969.
 53. Smith B, Mattison D, Sipes I. The role of epoxidation in 4-vinylcyclohexene-induced ovarian toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1990;105:372-381.
 54. Mayer L, Pearsall N, Christian P, Devine P, Payne C, McCuskey M, Marion S, Sipes I, Hoyer PB. Longterm effects of ovarian follicular depletion in rats by 4-vinylcyclohexene diepoxide. *Reprod Toxicol*. 2002;16:775-781.
 55. Davis B, Maronpot R, Heindel J. Di-(2-ethylhexyl)phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1994;128:216-223.
 56. Davis B, Weaver R, Gaines L, Heindel J. Mon-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of FSHcAMP stimulation in rat granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1994;128:224-228.
 57. Lovekamp-Swan T, Davis B. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *EnvironHealth Perspect*. 2003;111:139-145.
 58. Li X, Johnson D, Rozman K. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on estrous cyclicity and ovulation in female Sprague-Dawley rats. *Toxicol Lett*. 1995;78:219-222.
 59. Ronnback C, Rooij D. Effects of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl on foetal germ cells in two mouse strains after repeated treatment of the dams during and after pregnancy. *Pharmacol Toxicol*. 1994. 1994;74:287-293.
 60. Younglai E, Foster W, Hughes E, Trim K, Jarrell J. Levels of environmental contaminants in human follicular fluid, serum and seminal plasma of couples undergoing in vitro fertilization. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2002;43:121-126.
 61. Waalkes M, Rehm S. Lack of carcinogenicity of cadmium chloride in female Syrian hamsters. *Toxicology*. 1998;126:173-178.
 62. Piasek M, Schonwald N, Blanus M, Kostial K, Laskey JW. Biomarkers of heavy metal reproductive effects and interaction with essential elements in experimental studies on female rats. *Arch Hig Rada Toksikol*. 1996;47:245-259.
 63. Dearth R, Hiney J, Srivastava V, Burdick S, Bratton G, Dees W. Effects of lead (Pb) exposure during gestation and lactation on female pubertal development in the rat. *Reprod Toxicol*. 2002;16:343-352.
 64. Taupeau C, Poupon J, Nome F, Lefevre B. Lead accumulation in the mouse ovary after treatment-induced follicular atresia. *Reprod Toxicol*. 2001;15:385-391.
 65. Davis B, Price H, O'Connor R, Fernando R, Rowland A, Morgan D. Mercury vapor and female reproductive toxicity. *Toxicol Sci*. 2001;59:291-296.
-