



CNEN/SP

ipen *Instituto de Pesquisas
Energéticas e Nucleares*

GOVERNO DO BRASIL

TÉCNICA DE FERTILIZAÇÃO IN VITRO E CULTURA DE
EMBRIÕES DE CAMUNDONGO DURANTE A PREIMPLANTAÇÃO

Olivia Kimiko KIKUCHI e Takeshi YAMADA

IPEN Pub 383

MARÇO/1993

SÃO PAULO

**TÉCNICA DE FERTILIZAÇÃO IN VITRO E CULTURA DE EMBRIÕES DE
CAMUNDONGO DURANTE A PRÉ IMPLANTAÇÃO**

Olivia Kimiko KIKUCHI e Takeshi YAMADA

DEPARTAMENTO DE APLICAÇÕES NA ENGENHARIA E INDÚSTRIA

**CNEN/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
SÃO PAULO – BRASIL**

Série PUBLICAÇÃO IPEN

INIS Categories and Descriptors

C00 00

EMBRYOS
FERTILIZATION
IN VITRO
CULTURE MEDIA

IPEN Doc-4583

Aprovado para publicação em 21/01/83

Nota: A redação, ortografia, conceitos e revisão final são da responsabilidade do(s) autor(es)

**TÉCNICA DE FERTILIZAÇÃO "IN VITRO" E CULTURA DE EMBRIÕES DE
CAMUNDONGO DURANTE A PRÉ-IMPLANTAÇÃO**

Olivia Kimiko KIKUCHI e Takeshi YAMADA*

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGETICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05422-970 - São Paulo, SP - BRASIL

R E S U M O

O embrião de mamífero consiste em um sistema no qual ocorre uma intensa proliferação celular sendo altamente radiosensível e portanto adequado ao estudo dos efeitos biológicos das radiações ionizantes. A técnica de fertilização "in vitro" e cultura de embriões de camundongo durante o período de pré-implantação modificada por Yamada e col (1982) para melhorar a eficiência na obtenção de blastocistos em mais de 95% e descrita no presente trabalho, como resultado de estágio realizado na divisão de Biologia do National Institute of Radiological Sciences (NIRS)

* NATIONAL INSTITUTE OF RADIOLOGICAL SCIENCES - NIRS -
Chiba, Japão

TECHNIQUE OF THE "IN VITRO" FERTILIZATION AND THE CULTURE OF
MOUSE EMBRYOS AT PREIMPLANTATION

Olivia Kimiko KIKUCHI and Takeshi YAMADA*

COMISSÃO NACIONAL DE ENERGIA NUCLEAR/SP
INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Caixa Postal 11049 - Pinheiros
05422-970 - Sao Paulo SP - BRASIL

A B S T R A C T

The mammal embryo is an intensive cellular proliferating system very radiosensitive and therefore adequate to the study of the biological effects of ionizing radiation. The technique of the "in vitro" fertilization and the culture of mouse embryos at preimplantation period modified by Yamada et al (1982) to improve the efficiency of more than 95% of blastocyst formation is described.

* NATIONAL INSTITUTE OF RADIOLOGICAL SCIENCES - NIRS -
Chiba Japan

I N T R O D U Ç Ã O

Os efeitos biológicos das radiações ionizantes tem sido objeto de pesquisa de grande interesse no mundo inteiro, principalmente após o lançamento das bombas atômicas sobre Hiroshima e Nagasaki e de vários testes nucleares que causaram a morte e danos irreversíveis em seres humanos e no meio ambiente

O avanço da tecnologia com a crescente utilização de técnicas nucleares e a construção de reatores nucleares, apesar dos enormes benefícios para a humanidade também causou recentemente acidentes graves como o do reator nuclear de Chernobyl e com a fonte de cesio-137 em Goiânia envolvendo seres humanos inclusive mulheres grávidas. No entanto mulheres no início da gravidez podem acabar se expondo a radiação ionizante ao se submeterem a algum exame radiológico por exemplo sem ter conhecimento prévio do seu estado fisiológico

O sistema embrionário é constituído por células proliferativas que se dividem de forma notável e controlada com o objetivo de formar um novo indivíduo, ao contrário das células cancerosas que se dividem e proliferam desordenadamente até a destruição do organismo

O desenvolvimento embrionário de mamíferos continua sendo objeto de estudo de grande interesse e o animal de laboratório utilizado com grande sucesso tem sido o camundongo que normalmente gera uma ninhada grande de filhotes por fêmea. Servindo-se de métodos artificiais para a indução de super-ovulação com injeção de hormônio e possível aumentar o número de filhotes para mais de vinte por fêmea o que seria impossível se fossem utilizados primatas por exemplo. Mas no caso do desenvolvimento inicial do embrião as diferenças não são muito grandes entre os mamíferos

O embrião é um sistema altamente radiosensível sendo que a fase mais sensível à radiação ionizante é a denominada pró-nuclear que no camundongo corresponde a 6 horas após a fertilização (YAMADA e cols. 1962). Os efeitos das radiações ionizantes não variam quando os embriões de camundongo são irradiados "in vitro" ou "in vivo" (JACOBET e GRINEIRO 1960), mas a manipulação "in vitro" apresenta vantagens por permitir estabelecer com exatidão o momento da inseminação dos óvulos, selecionar previamente os ovos normais e possibilitar o acompanhamento do desenvolvimento embrionário fora do organismo materno.

O cultivo "in vitro" de embriões de camundongo vem sendo realizado eficientemente em muitos laboratórios de pesquisa do mundo inteiro o que não ocorre com a fertilização "in vitro" com posterior obtenção de uma alta eficiência na formação de blastocistos como descrito na metodologia de Yamada e cols. A manutenção de embriões sob condições controladas sem a influência do organismo materno, é importante para que o trabalho de pesquisa possa ser reproduzível em qualquer outro laboratório e sem que haja a suspeita de que os resultados obtidos possam ter sofrido a influência de parâmetros indesejáveis.

A linhagem do camundongo fêmea parece ser um dos pontos críticos para o sucesso do experimento mas o híbrido BC3F₁, que apresenta resultados excelentes não é difícil de ser obtido. Outro ponto crítico de importância relevante é a qualidade da água e dos reagentes para o preparo dos meios de cultura. Os reagentes com confiabilidade ainda são os importados e mesmo assim devem ser renovados periodicamente.

A improvisação na manutenção dos embriões e no preparo dos meios de cultura deve ser prontamente descartada pois o sistema é extremamente sensível e depende do sacrifício de vários animais. Uma vez que a metodologia a ser descrita neste trabalho já está muito bem estabelecida é recomendável

que ela seja seguida a risca. Por outro lado cultivar embriões de camundongo não requer equipamentos específicos e exclusivos. Uma boa estufa de CO₂ que mantenha a mesma temperatura interior e com atmosfera úmida, assim como um microscópio invertido de contraste de fase e um fluxo laminar são equipamentos necessários também para muitos tipos de cultura de células.

O presente trabalho tem como objetivo descrever detalhadamente a técnica de cultivo e fertilização "in vitro" de embriões de camundongo modificada por Yamada e col que conseguem uma eficiência de mais de 95% na formação de blastocistos. O estabelecimento de uma cultura completa desde a fertilização "in vitro" até a formação de blastocisto com elevada eficiência é de grande importância pois segundo esses autores permite uma quantificação precisa do dano da radiação no período mais sensível do desenvolvimento dos mamíferos.

M E T O D O L O G I A

ANIMAIS camundongos fêmea BC3F, de 3-4 meses
camundongos macho ICR de 3-6 meses

DIA -3 (16 00 h) injeção intra-peritoneal de 7 5 I U de hormônio PMS (Pregnant Mare Serum)

DIA -1 (16 00 h) injeção intra-peritoneal de 7 5 I U de hormônio HCG (Human Chorionic Gonadotropin)

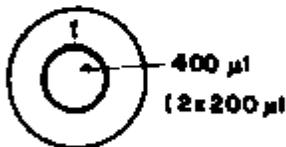
Preparação das microgotas de meio de fertilização (TYH) e de cultura (M280). Os meios já com BSA e EDTA são filtrados em Millipore e as microgotas são semeadas em placas de Petri descartáveis (30x10 mm), esterilizadas, sendo cobertas por parafina líquida autoclavada. As

microgotas são mantidas na estufa de CO₂ a 37°C para serem utilizadas no dia seguinte

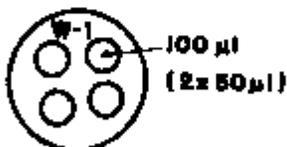
DIA 0 (8 00 h) sacrifício de um camundongo macho para coletar o esperma que deve ser imediatamente imerso no meio TYH, onde permanece por uma hora a 37°C para capacitação
 Sacrifício dos camundongos fêmea para coleta dos óvulos que também devem ser imersos imediatamente no meio TYH e mantidos a 37°C

DIA 0 (9 00 h) FERTILIZAÇÃO "IN VITRO", pipetando 5 a 10 microlitros de esperma sobre a microgota contendo os óvulos
 Afundar a gotinha de esperma que fica flutuando na parafina líquida tocando-a com a ponta de um estilete esterilizado
 Retornar a placa de Petri imediatamente para a estufa

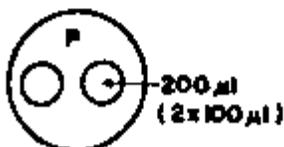
DIA 0 (13 00h) seleção dos ovos fertilizados, com o auxílio de um microcapilar esterilizado e lupa Manter ao lado da lupa uma placa aquecedora a 37°C



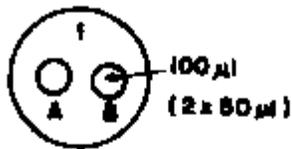
Succionar os ovos viáveis fertilizados e lavá-los soltando-os em uma região limpa da microgota de TYH Repetir o processo duas vez



Transferir os ovos para a placa de Petri W com 4 microgotas de M280 Cada microgota corresponde a uma fêmea doadora dos óvulos Lavar os ovos por duas vezes



Transferir todos os ovos para uma microgota da placa de Petri correspondente ao Pool com M280 Transferir os ovos para a outra microgota do Pool



Distribuir numero igual de ovos por microgota das placas com M280. Geralmente são colocados 20 ovos por microgota.

Incubar a 37°C em atmosfera unida contendo 5% de CO₂, durante 4 dias até o desenvolvimento dos blastocistos expandidos.

COLETA DE ESPERMA DE CAMUNDONGOS ICR

A coleta de esperma é realizada de um macho sadio de 3-6 meses cujo sacrificio, dissecação e coleta propriamente dita devem ser realizados o mais rapidamente possível, registrando-se a hora. O tempo ideal para esse processo é de 2 minutos para cada epididimo caudal.

- 1 Sacrificar o camundongo por deslocamento cervical.
- 2 Colocar o animal sobre uma folha de papel toalha com o abdome voltado para cima limpando a região abdominal com algodão embebido em álcool 70%.
- 3 Puxar a pele da barriga na região inferior com uma pinça grande e dar um picote na pele suspensa cortando em V para cima, expondo os órgãos internos.
- 4 Deslocar o intestino e a massa de gordura para cima com duas pinças de ponta fina expondo os testiculos.
- 5 Puxar o testiculo e localizar o epididimo caudal que deve ser separado cuidadosamente com uma tesoura pequena de ponta fina e com o auxilio de uma pinça pequena de ponta fina. O testiculo pode ser cortado junto com o epididimo caudal e separado depois sobre uma folha de papel de filtro esterilizado previamente com luz ultra-violeta.
- 6 Retirar cuidadosamente o sangue das veias do epididimo passando o dorso da pinça de ponta fina sobre a sua superficie.

- 7 Segurar o epidídimo caudal entre os dedos indicador e polegar fazendo um picote com a tesoura pequena de ponta fina. Com uma leve pressão dos dedos o sêmen sai pelo corte devendo ser imediatamente coletado com um estilete esterilizado e imerso na microgota de meio de fertilização TYH.
- 8 Observar na lupa se os espermatozoides estão se movimentando ativamente.
- 9 Devolver a placa de Petri com a microgota contendo os espermatozoides na estufa a 37°C.
- 10 Coletar o esperma do outro epidídimo caudal.
- 11 Deixar os espermatozoides na estufa por uma hora para capacitação.

CONTAGEM DOS ESPERMATOZOIDES

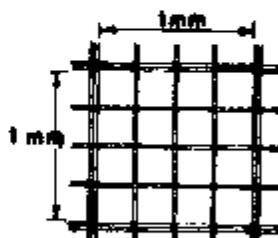
- 1 A amostra de espermatozoides para contagem é preparada pipetando-se 10 microlitros do meio TYH contendo os espermatozoides em 90 microlitros de solução 3% de NaCl. Se a preparação estiver muito densa realizar uma diluição.
- 2 Pipetar 10 microlitros da solução acima contendo os espermatozoides em cada compartimento de uma câmara Burker-Turk de 1/10 mm de profundidade.
- 3 Contar os espermatozoides em um microscópio óptico, com o auxílio de um contador de células manual.

CÂMARA BURKER-TURK

Especificações volume de $1 \times 1 \times 0,1 \text{ mm} = 0,1 \text{ mm}^3$ ou 0,1 microlitro

A câmara contém 4 quadrados com o volume de 0,1 microlitro cada divididos em uma malha de 16 quadrados menores.

A contagem é feita estabelecendo-se um critério para considerar os espermatozóides que caem sobre as linhas superior e lateral direita, a critério do pesquisador



Exemplo

Volume de esperma pipetado na fertilização 10 microlitros
 Diluição 8 vezes (10 microlitros do esperma + 70 microlitros de solução de NaCl)
 Numero de espermatozóides contados em um quadrado de 0,1 microlitro 70

Temos então 70 espermatozóides em 0,1 microlitro ou
 700 espermatozóides em 1 microlitro

Como foi diluído 8 vezes temos $700 \times 8 = 5600$ espermatozoides/microlitro

Como na fertilização foram pipetados 10 microlitros, temos $5600 \times 10 = 56000$ espermatozóides

Como cada microgota de meio TYH tem 400 microlitros, calculamos que a contagem final será igual a $56000 / 400 = 140$ espermatozóides/microlitro

O ideal para uma boa fertilização fica entre 50-150 espermatozóides/microlitro. Uma densidade muito alta causará dificuldades durante o processo de lavagem dos ovos fertilizados e uma densidade muito baixa pode acarretar uma taxa de fertilização baixa.

COLETA DOS OVULOS

Os ovulos são coletados de camundongos fêmeas da linhagem BC3F, com idade de 3-4 meses superovuladas. Como a coleta é feita durante o período em que os espermatozoides estão em capacitação o tempo gasto para a coleta os ovulos não deve ultrapassar mais de uma hora sendo aconselhável a anotação dos horários em que cada animal foi sacrificado. O tempo ideal para a dissecação e coleta dos ovulos de cada fêmea é de 3 minutos o que corresponde a meia hora se forem utilizados 10 animais. Com este numero de fêmeas superovuladas é possível a obtenção de mais de 200 ovos fertilizados.

- 1 Sacrificar a fêmea por deslocamento cervical
- 2 Limpar o abdômen com algodão embebido em álcool 70%
- 3 Puxar a pele do abdômen para cima com uma pinça grande e dar um picote com uma tesoura, cortando a pele em V de baixo para cima expondo os órgãos internos
- 4 Deslocar para cima o intestino e para baixo a gordura que cobre o utero e os ovários com duas pinças pequenas de ponta fina
- 5 Puxar o utero e pinçar próximo ao oviduto
- 6 Cortar o utero e a pele transparente que o acompanha com uma tesoura pequena de ponta fina
- 7 Cortar o oviduto do lado oposto ao utero rente ao ovário que tem coloração rosa
- 8 Sobre um papel de filtro previamente esterilizado com luz ultra-violeta separar o oviduto do resto do utero, dando um picote com a ponta da tesoura pequena de ponta fina
- 9 Imergir o oviduto na parafina líquida da placa de Petri que contem a microgota com meio de cultura e que foi preparada no dia anterior e mantida a 37°C. A placa de

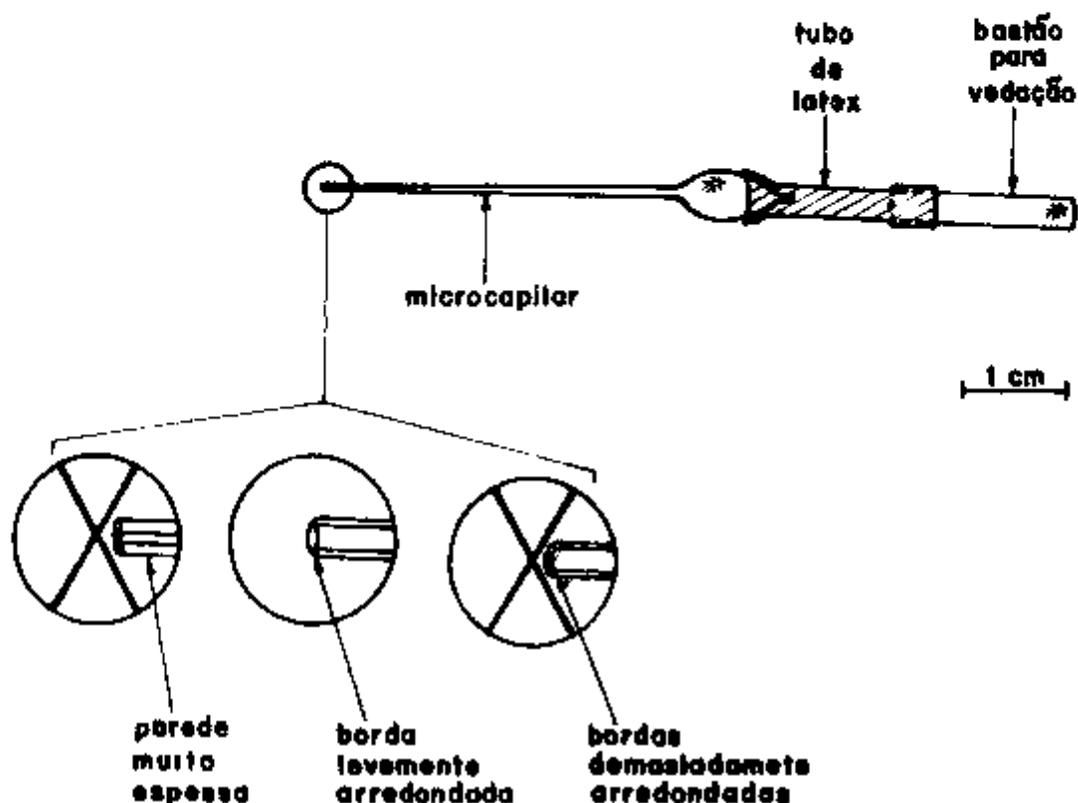
Petri ao ser retirada da estufa deve permanecer sobre uma chapa aquecedora a 37°C

- 10 Retirar o outro oviduto
- 11 Com o auxílio de uma lupa e de dois estiletes esterilizados furar a região mais inchada do ovário e puxar com a ponta do estilete a massa de óvulos para dentro da microgota
- 12 Desprezar os ovidutos vazios
- 13 Devolver imediatamente a placa de Petri com os óvulos para a estufa

CONFECCÃO DE CAPILARES PARA A SELEÇÃO DOS OVOS

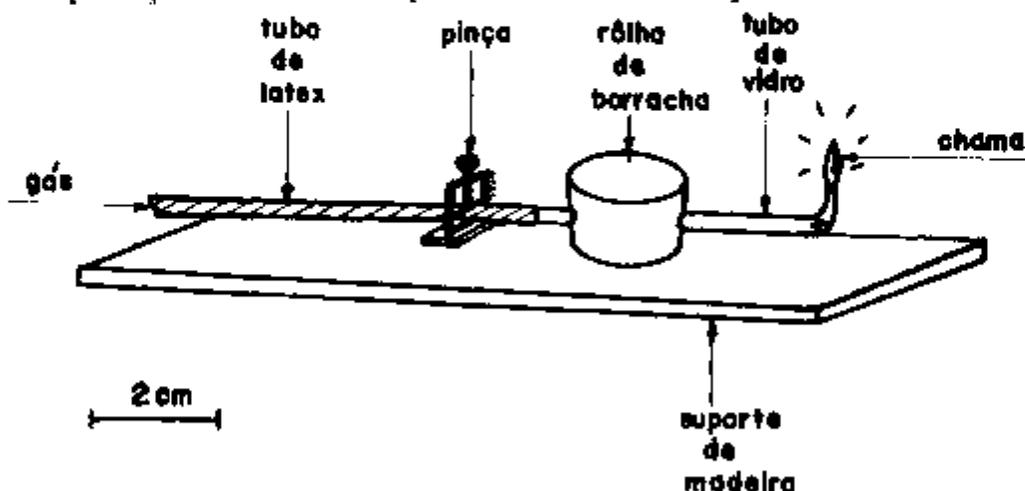
- 1 Cortar tubos de vidro com diâmetro interno de 3 mm em comprimento de aproximadamente 30 cm
- 2 Lavar os tubos cortados com detergente Extran apropriado para vidrarias de cultura de células Enxaguar no lavador de pipetas
- 3 Secar em estufa
- 4 Confeccionar bulbos com o auxílio de um maçarico, tomando-se o cuidado para que as extremidades não fiquem colabadas
- 5 Observar todos os bulbos na lupa para ver qual a extremidade mais adequada a ser usada e cortar com uma lixa no comprimento ideal
- 6 Arredondar a borda da extremidade escolhida em chama pequena de um mini-bico de Bunsen Examinar rigorosamente na lupa se a borda não possui ranhuras que possam danificar os ovos e se a abertura não ficou estreita demais como pode ser visto na figura
- 7 Cortar a outra ponta do bulbo e arredondar o local do corte por segurança
- 8 Enxaguar os capilares dentro de um béquer esterilizado, passando 3 vezes em água destilada

- 9 Cobrir o béquer com papel alumínio e esterilizar os capilares em estufa a 140°C por pelo menos 3 horas



MINI-BICO DE BUNSEN

O mini-bico de Bunsen utilizado na confecção de capilares pode ser feito no laboratório com os seguintes materiais: uma pipeta Pasteur, uma rolha de borracha, uma pinça, um tubo de latex para ser conectado à saída de gás e um pedaço de madeira para servir de suporte.



**MEIOS DE CULTURA PARA FERTILIZAÇÃO "IN VITRO"
E MANUTENÇÃO DA CULTURA DE EMBRIÕES DE CAMUNDONGO**

1 Solução estoque A (para TYH)

NaCl	6,976 g
KCl	0 356 g
CaCl ₂ 2H ₂ O	0 251 g
KH ₂ PO ₄	0 162 g
MgSO ₄	0 293 g
H ₂ O q s p *	100 ml de solução

2 Solução estoque B (para TYH e M280)

NaHCO ₃	2 587 g
H ₂ O q s p	200 ml de solução

-Usar H₂O bidestilada

-Preparar novas soluções a cada mês

3 Solução de trabalho TYH (meio de fertilização)

		H ₂ O	10 ml
H ₂ O	40 ml	glicose	100 mg
Sol estoque A	10 ml	Na-piruvato	11 mg
		Sol estoque B	16 3 m
		H ₂ O q s p	100 ml

-Validade da solução TYH uma semana

* q s p quantidade suficiente para

Preparo das microgotas de meio de fertilização TYH

TYH	10 ml
BSA	40 mg
EDTA 10 mM	10 microlitros

-Validade da solução um dia

4 Solução de trabalho M280 (meio de cultura)

H ₂ O	40 ml		
NaCl	421,5 mg		
KCl	35,6 mg		
Ca-lactato	52,7 mg	H ₂ O	10 ml
KH ₂ PO ₄	16,2 mg	glicose	100 mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	21,3 mg	Na-piruvato	3,3 mg

↓

Sol estoque B	16,3 ml
Na-lactato	0,43 mg

↓

H ₂ O q s p	100 ml
------------------------	--------

-Validade da solução de cultura M280 uma semana

Preparo das microgotas de meio M280

M280	10 ml
BSA	40 mg
EDTA 10 mM	10 microlitros

-Validade da solução um dia

PREPARO DAS PLACAS DE PETRI COM AS MICROGOTAS DE
MEIOS TYH E M280

As placas com as microgotas de meio de fertilização TYH e de cultura M280 devem ser preparadas no dia anterior ao experimento (dia -1)

A soro albumina bovina (BSA) deve ser retirada da geladeira pois tem que ser pesada a temperatura ambiente Os meios TYH e M280 são pipetados com pipetas esterilizadas, enxaguando-se com os próprios meios os frascos nos quais serao preparados A BSA deve ser colocada com muito cuidado no frasco, para evitar que grude na parede, e é aconselhavel dissolvê-la com muito cuidado sem agitar o frasco Só após a completa dissolução da BSA acrescenta-se o EDTA com uma pipeta automática com a ponteira esterilizada

No fluxo laminar os meios já com a BSA e o EDTA são transferidos dos frascos para os tubos de plástico descartáveis (10 ml) usando seringas descartáveis e millipore descartavel para filtrar os meios Para retirar o meio do frasco utiliza-se a seringa com a agulha, esta sendo então descartada para se adaptar o millipore Antes de transferir o meio para o tubo desprezar pelo menos 5 gotas

Numerar as placas escrevendo ao inverso na parte externa do fundo Pipetar com pipetas ou ponteiras descartáveis só metade do volume total da microgota do meio Preencher a placa com a parafina liquida sem cobrir completamente a microgota pipetar a metade restante do meio e cobrir a microgota com mais parafina Preparar uma placa ou duas no maximo de cada vez para evitar evaporação do meio de cultura Incubar a 37°C

**EQUIPAMENTOS PARA MONTAGEM DO LABORATORIO DE
CULTURA DE EMBRIOES**

- 1 Fluxo laminar
- 2 Estufa de CO₂ com atmosfera umida e controle de temperatura
- 3 Lupa
- 4 Microscopio óptico invertido de contraste de fase, com câmara fotográfica
- 5 Estufa para secagem e esterilização de material
- 6 Autoclave pequena
- 7 Refrigerador
- 8 Placa aquecedora com ajuste para 37°C
- 9 Timer
- 10 Contador de células manual
- 11 Bico de bunsen
- 12 Seladora para plastico
- 13 Termografo
- 14 Higrógrafo
- 15 Lavador de pipetas

REAGENTES PARA CULTURA DE EMBRIOES

- 1 Cloreto de sódio (NaCl)
- 2 Cloreto de potassio (KCl)
- 3 Cloreto de cálcio (CaCl₂ · 2H₂O)
- 4 Fosfato de potassio (KH₂PO₄)
- 5 Sulfato de magnésio (MgSO₄)
- 6 Carbonato de sodio (NaHCO₃)
- 7 Glicose
- 8 Piruvato de sodio
- 9 Soro albumina bovina (BSA)
- 10 Acido etileno-diamino-tetra-acetico (EDTA)

- 11 Lactato de calcio
- 12 Lactato de sodio
- 13 PMS (Pregnant mare serum)
- 14 HCG (Human chorionic gonadotropin)
- 15 Alcool etílico
- 16 Detergente Extran

MATERIAIS DE CONSUMO PARA CULTURA DE EMBRIÕES

- 1 Placas de Petri descartaveis esterilizadas de 3 cm de diametro por 1 cm de altura
- 2 Pipetas descartaveis graduadas e esterilizadas de 1 e 10 ml
- 3 Pipetas automaticas de 1-20 1-200 e 100-1000 microlitros e respectivas ponteiras descartaveis
- 4 Seringas e agulhas descartaveis e esterilizadas de 1 e 10 ml
- 5 Tubos de ensaio descartaveis esterilizados com tampa, de 15 ml
- 6 Tubos de vidro com 3 mm de diâmetro interno para confecção de microcapilares
- 7 Frascos de vidro transparentes de 50 ml
- 8 Frascos de vidro transparentes com tampa, de 250 ml
- 9 Pipetas de vidro graduadas de 25 ml
- 10 Bandejas de aluminio de 15x20 cm
- 11 Pro-pipetas
- 12 Bulbos para pipetas
- 13 Tubo de silicone com 4mm de diâmetro interno
- 14 Tesoura cirurgica de ponta fina pequena
- 15 Tesoura cirurgica de ponta fina media
- 16 Pinças cirurgicas de ponta fina pequena
- 17 Pinça cirurgica de ponta fina grande
- 18 Papel de filtro redondo com 10 cm de diâmetro

- 19 Câmara Burker-Turk de 1/10 mm de profundidade
- 20 Frascos de vidro de 5 ml
- 21 Algodão hidrófilo
- 22 Papel toalha
- 23 Papel higiênico fino ou lenços de papel
- 24 Sacos plásticos para 2 e 5 litros
- 25 Pincéis atômicos
- 26 Rolo de papel alumínio
- 27 Sacos para esterilização de ponteiros (mecking bag)
- 28 Tesoura grande
- 29 Folhas de papel manteiga
- 30 Espátulas pequena e grande
- 31 Provetas de 25, 50, 100, 500 e 1000 ml
- 32 Béquers de 25, 100, 500 e 1000 ml
- 33 Tubo de látex de 5 cm de diâmetro
- 34 Pipetas Pasteur
- 35 Pinças para tubos de látex
- 36 Rolhas de borracha de 4 cm de diâmetro
- 37 Cilindro de CO₂
- 38 Cilindro de oxigênio
- 39 Butijão de gás
- 40 Abajur de luz fria
- 41 Gaiolas para camundongo
- 42 Bebedouros para gaiolas
- 43 Folhas de cartolina
- 44 Ração para camundongo
- 45 Materiais de limpeza em geral

A G R A D E C I M E N T O S

O estágio realizado no NIRS foi financiado pela Japan International Cooperation Agency (JICA)

R E F E R E N C I A S
B I B L I O G R A F I C A S

JACQUET P & GRINFELD S Influence of some methodological factors on the radiosensitivity of the mouse zygote
TERATOLOGY 42 453-462 1990

YAMADA T YUKAWA O ASAMI K & NAKAZAWA T Effect of chronic HTO beta or ⁶⁰Co gamma radiation on preimplantation mouse development "in vitro" RADIAT RES 92 359-369 1982