

ANÁLISE MORFOLÓGICA DO DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE *GALLUS GALLUS* SUBMETIDOS AO CLORETO DE MANGANÊS

POPP, Natália Kleemann^{*}
DEBIASI, Marcelina Mezzomo^{**}
D'AGOSTINI, Fernanda Maurer^{***}

Resumo

Os vertebrados apresentam semelhanças nas primeiras fases do desenvolvimento embrionário; assim, a utilização de embriões de aves é de grande relevância em estudos com compostos químicos, pois, mesmo mantendo suas peculiaridades, possuem a mesma complexidade morfológica em relação aos embriões de mamíferos. Níveis elevados de manganês podem causar sérios problemas à saúde humana, afetando o sistema nervoso central e atuando de forma neurotóxica. Neste estudo, buscou-se analisar morfológicamente embriões de *Gallus gallus*, utilizados como modelo experimental, expostos em diferentes concentrações de cloreto de manganês e em diferentes períodos do desenvolvimento para avaliar o efeito toxicológico desse metal. Foram utilizados 240 ovos embrionados divididos em quatro grupos experimentais: Grupo controle 1, ovos fechados, sem intervenções, Grupo controle 2, injetada solução salina tamponada com fosfato, veículo do contaminante, na câmara de ar, Grupos 3 e 4 expostos ao cloreto de manganês, nas concentrações de 50 μM e 100 μM , respectivamente. Os embriões de quatro dias foram coletados, fixados em Carnoy, corados com Carmalúmen de Mayer e montados em lâmina histológica, e os embriões de sete dias foram coletados, fixados em solução ALFAC e preservados em álcool 70% para serem analisados. Os resultados demonstraram que os embriões de *Gallus gallus* expostos ao cloreto de manganês nas concentrações utilizadas não apresentam malformações no desenvolvimento embrionário quando comparados com o grupo controle. Sugere-se a realização de estudos adicionais utilizando-se maiores concentrações de cloreto de manganês para poder descartar a possibilidade de sua ação teratogênica durante o desenvolvimento embrionário. Palavras-chave: Desenvolvimento embrionário. *Gallus gallus*. Cloreto de manganês. Análise morfológica.

1 INTRODUÇÃO

O manganês (Mn) é considerado um dos metais mais abundantes; é encontrado em grande escala na crosta terrestre, assim como em rochas, solos, água e alimentos. No Brasil, é considerado um recurso natural importante, pelas reservas existentes e como matéria-prima para produção do aço e ferroligas, assim como é utilizado em indústrias para produção de pilhas eletrolíticas, eletrodos para solda, cerâmica, ligas especiais, produtos químicos e vidro (MARTINS; LIMA, 2001; NEVES; MENDONÇA JÚNIOR; MOREIRA, 2009).

Para a saúde humana, o manganês é um micronutriente essencial, porém, quando em níveis elevados no organismo, desencadeia uma desordem neurológica. Os problemas de saúde relacionados à exposição a altos níveis de manganês resultam em um quadro crônico da doença conhecida como manganismo, doença similar aos sintomas do Parkinson, afetando várias funções neurológicas (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1999). Há grande preocupação com a exposição ao manganês, pois os sintomas de toxicidade podem aparecer lentamente, ao longo de meses ou anos, e, ainda, sofrer influência de acordo com a espécie atingida, a forma de exposição e a maneira como o organismo responde à intoxicação. O Mn apresenta potencialidade em penetrar a barreira hemato-encefálica e

* Graduada em Biologia pela Universidade do Oeste de Santa Catarina de Joaçaba; natipopp@hotmail.com

** Especialista em Biologia Celular e Tecidual pela Universidade Federal do Paraná; Professora e Pesquisadora da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade do Oeste de Santa Catarina - Laboratório de Embriologia; marcelina.debiasi@unoesc.edu.br

*** Doutora em Zoologia pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; Professora e Pesquisadora da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade do Oeste de Santa Catarina - Laboratório de Doenças infectoparasitárias e Educação em Saúde - de Joaçaba, SC; fernanda.dagostini@unoesc.edu.br

atravessa em quantidade limitada a membrana placentária durante o período gestacional, assim, permitindo atingir o feto em desenvolvimento (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2008).

Níveis elevados de exposição ao Mn causam mudanças no comportamento e diminuição no aprendizado. Em alguns casos, tais níveis de exposição têm sido suspeitos de causar sintomas severos da doença manganismo, incluindo dificuldade em falar e andar. Há evidências de que a exposição ambiental excessiva ao Mn tem efeito na cognição das crianças e também na função intelectual materna (MENEZES FILHO, 2009). Porém, em relação ao período embrionário, não há estudos que esclareçam a possível toxicidade em embriões expostos a níveis elevados de manganês.

Até o momento não se tem como confirmar a toxicidade do cloreto de manganês durante o desenvolvimento embrionário. Assim, é relevante a análise morfológica de embriões de *Gallus gallus* usados como modelo experimental, expostos em diferentes concentrações de cloreto de manganês, em diferentes períodos de desenvolvimento embrionário, para avaliar o efeito toxicológico desse metal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de uso em Animais da Universidade do Oeste de Santa Catarina sob a extensão do Protocolo n. 005/2012. Para o experimento, foram utilizados ovos fertilizados de *Gallus gallus* higienizados, e, em seguida, foi realizada a análise de rachaduras na casca e separados por equivalência de peso. Foram utilizados 240 ovos, sendo que 120 foram abertos após quatro dias de incubação, e 120, após sete dias de incubação.

Para análise dos embriões com quatro dias de incubação, foram utilizados 120 ovos, 30 destes foram utilizados para o controle sem perfuração da casca (controle fechado), 30 ovos injetados com o veículo controle PBS (tampão fosfato-salino utilizado para diluir e inocular o cloreto de manganês), 30 ovos injetados com o cloreto de manganês a 50 μM e 30 ovos injetados com 100 μM de cloreto de manganês.

Para os embriões com sete dias de incubação, foram utilizados 120 ovos, 30 destes para controle fechado, 30 como controle de PBS, 30 contaminados com cloreto de manganês na concentração 50 μM e 30 contaminados com 100 μM . Foi realizada a perfuração da casca do ovo na região da câmara de ar, com agulha mais espessa para facilitar a entrada da agulha de insulina para administração do cloreto de manganês e PBS na vesícula vitelínica, posteriormente o orifício foi fechado com uma fita adesiva. Após foram submetidos à incubação a 37 °C, umidade relativa de 65 a 75%, em ambiente asséptico.

2.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA

2.1.1 Embriões com quatro dias de incubação

Para análise morfológica dos embriões com quatro dias de incubação, foi utilizada a técnica de montagem total. Noventa e seis horas após a incubação, os ovos foram abertos e seus discos embrionários recortados com o auxílio de tesoura e pinça. Posteriormente, foram transportados para placa de Petri contendo PBS. Os embriões foram lavados em PBS para remover o excesso de vitelo.

Sobre o disco embrionário foi colocado um papel filtro retangular com um recorte em forma de losango na região central encaixada exatamente sobre o embrião, para mantê-lo distendido e submerso na solução fixadora. Em seguida, os embriões foram fixados em solução fixadora de Carnoy, por 2 horas à temperatura ambiente em uma placa de Petri fechada.

Após a fixação, os embriões passaram por uma lavagem em água destilada e colocados em etanol 70%, onde permaneceram por 12 horas. Para a coloração, os embriões foram hidratados em água destilada por 10 minutos e submersos no corante Carmalúmen de Mayer por aproximadamente 48 h. Depois de corados, os embriões foram desidratados em série alcoólica crescente (etanol a 70%, 80%, 95%, 100% I e 100% II; 10 min em cada banho) e, em seguida, diafanizados em dois banhos consecutivos de xileno (xilol), por 10 min cada.

Para a montagem das lâminas permanentes, foi utilizada a resina Permount®. Após a confecção das lâminas, a análise morfológica foi realizada em microscópio de campo claro Bioval e fotografadas com câmara digital.

2.1.2 Embriões com sete dias de incubação

Os ovos que permaneceram por sete dias na incubadora após a exposição, foram abertos e, com auxílio de pinça, foram retirados os embriões com suas membranas anexas. Posteriormente, os embriões foram removidos das membranas e lavados com PBS. Visando facilitar a entrada do fixador nos embriões, foram realizadas duas perfurações com agulha, uma na porção cefálica e outra na porção caudal.

Em seguida, os embriões foram fixados em solução ALFAC (85 ml de etanol 80%, 5 ml de ácido acético 99,7% e 10 ml de formol 37%), por 6 horas em temperatura ambiente, após, transferidos para etanol 70%. Posteriormente, os embriões foram analisados com auxílio de estereomicroscópio Quimis. Após as análises morfológicas, os embriões foram mantidos em etanol 70%.

2.1.3 Determinação do estágio embrionário

O estágio de desenvolvimento embrionário foi determinado de acordo com o número de somitos e com as características descritas em cada estágio, segundo Hamburger e Hamilton (1951).

3 RESULTADOS

3.1 EMBRIÕES COM QUATRO DIAS DE INCUBAÇÃO

As análises do desenvolvimento embrionário foram constituídas por todos os embriões vivos no momento da abertura dos ovos, até mesmo aqueles com as membranas rompidas. No grupo controle fechado, 90% dos ovos incubados continham embriões vivos, no grupo controle injetado com PBS, 97%, e os embriões expostos ao cloreto de manganês (50 μM e 100 μM) apresentaram taxas de 97% e 93,3%, respectivamente.

Os estádios embrionários foram determinados considerando-se o número de somitos, desenvolvimento do sistema nervoso central e dos membros e estruturas em geral, segundo Haburguer e Hamilton (1951). Foi possível determinar quatro estádios embrionários (17, 18, 19 e 20), com o predomínio de embriões no estágio 20, conforme Tabela 1.

Alterações morfológicas foram observadas no início do experimento em apenas um embrião do grupo contaminado com o cloreto de manganês na concentração 50 μM , em que apresentou estágio embrionário atrasado, alterações no encéfalo, propriamente dito no mesencéfalo, prosencéfalo e rombencéfalo, assim como alteração nos olhos; não ocorreram repetições dessas alterações.

Até o final do estudo não ocorreram alterações morfológicas no desenvolvimento embrionário dos embriões de *Gallus gallus* pertencentes ao grupo controle, grupo PBS, grupo exposto nas concentrações de 50 μM de cloreto de manganês e 100 μM de cloreto de manganês.

Tabela 1 - Estádios embrionários dos embriões com quatro dias de incubação

ESTÁDIO EMBRIONÁRIO	CONTROLE	PBS	50 μ M MnCl	100 μ M MnCl	TOTAL
17 HH	—	—	1	—	1(0,84%)
18 HH	1	—	2	1	4(3,33%)
19 HH	12	11	9	15	47(39,16%)
20 HH	13	16	17	11	57(47,50 %)
Embriões que romperam membrana	1	2	—	1	4(3,33%)
Embriões que não desenvolveram	3	1	1	2	7(5,84%)
Total de embriões	30 (25%)	30 (25%)	30 (25%)	30(25%)	120 (100%)

Fonte: os autores.

Imagem 1 - Embriões expostos ao cloreto de manganês incubados por quatro dias



Fonte: os autores.

Nota: A) Indivíduo exposto a 50 μ M de cloreto de manganês no estágio 17HH de desenvolvimento com alteração no mesencéfalo, prosencéfalo, rombencéfalo; B) Indivíduo exposto a 100 μ M de cloreto de manganês no estágio 20HH de desenvolvimento, com características morfológicas normais.

3.2 EMBRIÕES COM SETE DIAS DE INCUBAÇÃO

Os estádios embrionários foram determinados considerando-se o desenvolvimento do sistema nervoso central, dos membros e estruturas em geral, segundo Hamburger e Hamilton (1951). Foi possível determinar cinco estádios embrionários (26, 27, 28, 29 e 30), com o predomínio de embriões no estágio 29 e 30, conforme Tabela 2.

Foram observadas alterações morfológicas em diferentes grupos no início do experimento; no grupo controle fechado um embrião apresentava apenas um olho, no grupo com contaminação de cloreto de manganês na concentração 50 μ M foi observado um embrião com malformação no olho, outro com malformação no encéfalo. No grupo controle PBS foram observados dois embriões de gêmeos siameses. Até o término do experimento as alterações morfológicas não foram visualizadas em nenhum grupo estudado.

Tabela 2 - Estádios embrionários dos embriões com sete dias de incubação

ESTÁDIO EMBRIONÁRIO	CONTROLE	PBS	50 μ M MnCl	100 μ M MnCl	TOTAL
26 HH	1	1	3	1	6 (5%)
27 HH	1	1	—	2	4 (3,33%)
28 HH	5	9	7	8	29(24,17%)
29 HH	8	9	11	12	40 (33,33%)
30 HH	13	10	8	6	37(30,83%)
Embriões que não desenvolveram	2	—	1	1	4(3,33%)
Total de embriões	30 (25%)	30(25%)	30(25%)	30(25%)	120 (100%)

Fonte: os autores.

Imagem 2 - Embriões expostos ao cloreto de manganês incubados por sete dias



Fonte: os autores.

Nota: A) Embrião de gêmeos siameses pertencente ao grupo controle PBS; B) Embrião exposto à concentração de 100 μ M de cloreto de manganês no estágio embrionário 29HH, com características normais; C) Embrião exposto à concentração de 50 μ M de cloreto de manganês com malformação da vesícula e placode óptico. D) Embrião exposto à concentração de 50 μ M de cloreto de manganês no estágio embrionário 30 HH, com características normais.

4 DISCUSSÃO

O embrião de *Gallus gallus* é um bom modelo animal utilizado em estudos de embriologia comparada e biologia do desenvolvimento, principalmente no que diz respeito a agentes teratogênicos, pois são sensíveis aos agentes químicos. Ainda, são de fácil obtenção e manuseio, apresentam desenvolvimento embrionário em curto período, além de apresentar a praticidade em realizar o monitoramento e análises, uma vez que seu desenvolvimento é bem documentado (WOLPERT et al., 2000; GILBERT, 2003; HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Os embriões com quatro dias de incubação apresentam maior sensibilidade em seu manuseio, necessitando de cuidados, principalmente, no momento de abertura da casca do ovo, em que pode ocorrer o rompimento do disco embrionário e posterior perda do embrião.

Neste estudo, os embriões apresentaram um baixo grau de mortalidade, uma vez que poucos não se desenvolveram, provavelmente porque as galinhas matrizes dos planteis avícolas de onde se recebiam os ovos por meio de doação eram de boa qualidade, o que é imprescindível para um bom desenvolvimento embrionário. Os nutrientes essenciais para um bom desenvolvimento embrionário são provenientes da composição química do ovo; este fator é alterado de acordo com a idade da ave (SCHMIDT; FIGUEIREDO; ÁVILA, 2003). Segundo Campos (2000), o envelhecimento da ave influencia diretamente em sua fertilidade e na taxa de eclosão de ovos.

As malformações ocorridas no início do trabalho foram verificadas em alguns embriões dos grupos estudados (controle, PBS, 50 μ M), com quatro e sete dias de incubação. Essas alterações estavam relacionadas à formação do encéfalo e à morfologia geral do embrião, entretanto em baixo percentual quando comparadas ao número total de embriões utilizados; até o término do estudo não foram mais encontradas essas repetições de malformações embrionárias. Para que se tenha a confirmação da malformação e o que esta representa, as repeti-

ções devem acontecer, dessa forma, distingue-se o padrão patológico do normal (SCHATZ, 2003). Segundo Carlson (1996), quando se trabalha com o desenvolvimento embrionário, as falhas são inerentes.

Houve alterações no sistema nervoso central em alguns embriões do grupo controle fechado e controle PBS, sendo que estas podem estar relacionadas com erros genéticos intrínsecos ao desenvolvimento embrionário. Os defeitos relacionados a malformações com bases genéticas ou aberrações cromossômicas podem ocorrer mesmo que o embrião se encontre em um ambiente normal (GÓMEZ DUMM, 2006).

No decorrer do trabalho ocorreu mudança do local onde a chocadeira ficava armazenada, passando para uma sala com mais circulação de ar e, conseqüentemente, com temperatura mais amena. Os embriões que apresentaram malformações no início do estudo foram incubados no primeiro local, e os demais, que não apresentaram essas repetições de malformações embrionárias, foram incubados no segundo local. A partir do exposto, supõe-se que houve influência no que se diz respeito à temperatura da sala de armazenamento e à insuficiência de ventilação, havendo a necessidade de troca de CO₂ do interior da chocadeira com O₂ presente no local externo, que, nesse caso, não apresentava as condições ideais para isso. Segundo Lauvers e Ferreira (2011), com o sistema de ventilação, consegue-se renovar o ar do ambiente, reduzir o gás carbônico, microrganismo, dessa forma, refletindo no controle sanitário do incubatório.

A chocadeira tem por finalidade controlar as variáveis para uma boa incubação e que interferem diretamente no desenvolvimento embrionário, como temperatura, umidade relativa, ventilação e viragem dos ovos. Nesse modelo utilizado para o experimento não se tem como aprovar todas essas variáveis, ou, até mesmo, se houve queda de energia em algum momento da incubação, consistindo um fator de extrema influência. A temperatura e suas oscilações é o fator decisivo para o desenvolvimento do embrião e na determinação da eclodibilidade (ALDA, 1994).

Segundo Martin et al. (1996), as variáveis ambientais durante a incubação podem induzir a progressiva degeneração somática e a instabilidade homeostática, comprometendo a chance de sobrevivência do embrião. Esta condição pode ocasionar a morte do organismo ou alterar respostas fisiológicas, o que pode acarretar a diminuição do desenvolvimento ou um desenvolvimento anormal (BOLELI, 2003).

Observou-se que a maioria dos embriões não apresentou alterações morfológicas; as concentrações utilizadas neste estudo de 50 µm e 100 µm de cloreto de manganês podem ser baixas para confirmar a toxicidade nesse modelo animal utilizado. No estudo realizado com o mesmo modelo animal e as mesmas concentrações de contaminante houve significativo grau de alterações morfológicas, porém o índice elevado de falhas foi justificado supondo que elas poderiam ser decorrentes do transporte, manuseio, abertura da casca e condições da incubadora, além de apresentarem alta taxa de mortalidade do grupo geral estudado (DEBIASI, 2011).

Comparando-se as concentrações de cloreto de manganês utilizadas em outros estudos, com o modelo animal *Drosophila melanogaster*, notam-se alterações que foram observadas utilizando concentrações maiores, sendo de 0,1 mM, 0,5 mM e 1 mM de cloreto de manganês (TERNES, 2014).

Importante ressaltar que mesmo que os embriões não apresentem alterações morfológicas, esses indivíduos podem sofrer complicações comportamentais e locomotoras após o nascimento, segundo a literatura. No estudo realizado por Ternes (2014), verificou-se que as moscas expostas ao cloreto de manganês não apresentaram perdas locomotoras, ao contrário, foram mais ágeis no teste comportamental, indicando um possível comportamento hiperativo. Segundo Menezes Filho (2009), a exposição ao manganês está relacionada com implicação na cognição das crianças. Após a exposição a elevados níveis de manganês, os seres humanos apresentam complicações no sistema nervoso, assim como sintomas relacionados ao comportamento, dificuldade de andar e falar, movimentos lentos e desajeitados (AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY, 2008).

Neste estudo os resultados evidenciam que em embriões de *Gallus gallus* expostos a concentrações de 50 e 100 μM de cloreto de manganês não houve alterações morfológicas no desenvolvimento do embrião; assim, o cloreto de manganês não tem efeito teratogênico sobre o embrião nessas concentrações. Entretanto, são necessários estudos adicionais, em outros estádios de desenvolvimento embrionário e em maiores concentrações de cloreto de manganês, assim como em outros modelos animais para se fornecer melhor entendimento sobre os efeitos desse contaminante.

5 CONCLUSÃO

Por meio das análises morfológicas não foi possível observar alterações nos embriões de *Gallus gallus* expostos nas concentrações 50 μM e 100 μM de cloreto de manganês, incubados por quatro ou sete dias; assim, o cloreto de manganês nas concentrações utilizadas não apresentou efeito teratogênico.

Sugere-se a realização de estudos adicionais utilizando-se maiores concentrações de cloreto de manganês para poder descartar a possibilidade de sua ação teratogênica durante o desenvolvimento embrionário.

Morphological analysis of gallus gallus embryonic development submitted to the chloride of manganese

Abstract

The vertebrates present similarities in the first embryonic development phases; thus, the use of birds' embryos has a great relevance in studies with chemical compounds, because even keeping its peculiarities, they hold the same morphological complexity in relation to mammals' embryos. High levels of manganese can cause serious problems to the human health, affecting the central nervous system and acting in a neurotoxic way. In this study, it was searched to analyze morphologically embryos of Gallus gallus used as experimental model, exposed in different concentrations of chloride of manganese and in different periods of development to evaluate the toxicological effect of this metal. It was used 240 embryonated eggs divided in four experimental groups: Group control 1, closed eggs, no interventions, Group control 2, injected saline solution buffered with phosphate, contaminant mean, in the air assembly, Groups 3 and 4 exposed to the chloride of manganese, in the concentrations of 50 μM and 100 μM , respectively. The four-days embryos were collected, fixed in Carnoy, blushed with Mayer Carmalúmen and set in a histological blade and, the seven-days embryos were collected, fixed in ALFAC solution and preserved in alcohol 70% to be analyzed. The results showed that the Gallus gallus embryos exposed to the chloride of manganese in the used concentrations hasn't shown bad formation in the embryonic development when compared to the group control. It is suggested the realization of additional studies using major concentration of chloride of manganese to be able to discard the possibility of its teratogenic action during the embryonic development.

Keywords: Embryonic development. Gallus gallus. Chloride of manganese. Morphological Analysis.

REFERÊNCIAS

- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological Profile For Manganese**. Department of health and human services, 2008.
- ALDA, T. R. B. L. Causa de mortalidade embrionária e deformidades do embrião. **Manejo da Incubação**, Campinas: Facta, p. 169-176, 1994.
- BOLELI, I. C. Estresse, mortalidade e malformações embrionárias. In: MACARI, M.; GONZALES, E. (Ed.). **Manejo da Incubação**. 2. ed. Jaboticabal: Facta, p. 394-434, 2003.
- CAMPOS, J. E. **Avicultura razões, fatos e divergências**. Incubação Industrial. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 2000.

- CARLSON, B. M. **Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.
- DEBIASI, M. M. **Análise Morfológica da Ação do Cloreto de Manganês Durante o Desenvolvimento Embrionário Inicial de *Gallus gallus***. 2011. 48 p. Dissertação (Especialização em Biologia Celular e Tecidual)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- GILBERT, S. F. **Biologia do desenvolvimento**. 5. ed. Ribeirão Preto: FUNPEC, 2003.
- GOMÉZ DUMM, C. **Embriologia humana: Atlas e texto**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, i. 88, p. 49-92, 1951.
- LAUVERS, G.; FERREIRA, V. P. A. Fatores que afetam a qualidade dos pintos de um dia, desde a incubação até recebimento na granja. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Curitiba, v. 9, n. 16, p. 1-19, 2011.
- MARTIN, G. M et al. Genetic analysis of ageing: role of oxidative damage and environmental stresses. **Nature Genetics**, i. 13, n. 1, p. 25-34, 1996.
- MARTINS, I.; LIMA, I. Videira. **Ecotoxicologia do manganês e seus compostos**. Salvador: Centro de Recursos Ambientais (CRA), 2001. Séries cadernos de referência ambiental - série 4. v. 7.
- MENEZES FILHO, J. A. **Níveis elevados de manganês e déficit cognitivo em crianças residentes nas proximidades de uma metalúrgica ferro-manganês na Região Metropolitana de Salvador, Bahia**. 2009. 145 p. Tese (Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente)-Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2009.
- NEVES, E. B.; MENDONÇA JUNIOR, N.; MOREIRA, M. F. R. Avaliação da exposição a metais numa oficina de recuperação de armamento de uma organização militar. **Ciência Saúde Coletiva**, v. 14, n. 6, p. 2269-2280, 2009.
- SCHATZ, J. C. **Caracterização morfológica de embriões de *Gallus domesticus*, expostos ao acetato de chumbo, com ênfase na sua ação em nível tecidual e celular na medula**. Dissertação (Mestre em Neurociências)-Universidade Federal de Santa Maria, Florianópolis, 2003.
- SCHMIDT, G. S.; FIGUEIREDO, E. A. P.; ÁVILA, V. S. Incubação: Característica dos ovos incubados. **Avicultura Industrial**, Itu, n. 8, p. 18-24, 2003.
- TERNES, A. P. L. et al. *Drosophila melanogaster*-an embryonic model for studying behavioral and biochemical effects of manganese exposure. **EXCLI Journal**, v. 13, p. 1239-1253, 2014.
- WOLPERT, L. et al. **Princípios de Biologia do Desenvolvimento**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Manganese and its compounds**. Document 12. Concise International Chemical Assessment. Geneva, 1999.