

EFEITO DO CLORETO DE NÍQUEL SOBRE O FECHAMENTO DO PALATO

Sebastião HETEM*

Carla de Jesus de Almeida SCAPINELLI**

Celina Antonio PRATA***

Luciano Alves da SILVA***

- **RESUMO:** Camundongos fêmeas foram injetadas com 30 mg/kg de cloreto de níquel, no 10^o dia de gestação. Os animais foram sacrificados no 16^o dia de gestação, ao nascimento ou aos 3 dias de idade. Peças englobando a área do palato foram preparadas para análise histológica. Os resultados mostraram, no 16^o dia de gestação, o palato fechado, tecidos característicos revestindo as superfícies nasal e bucal, tecido conjuntivo na área de fusão e tecido ósseo mais evidente e mais próximo à linha média nos animais controle do que nos tratados. Nos demais períodos, as características eram semelhantes entre os dois grupos de animais. Concluiu-se que o cloreto de níquel atrasa, reversivelmente, o processo de ossificação do palato.
- **PALAVRAS-CHAVE:** Palato; cloreto de níquel; desenvolvimento do palato; teratogenicidade.

Introdução

Nos tempos modernos, uma das grandes preocupações dos sistemas públicos de saúde é a intoxicação por metais pesados, potencialmente sérios po-

* Departamento de Morfologia – Faculdade de Odontologia – FEB – 14783-226 – Barretos – SP.

** Monitora de Histologia e Embriologia – Departamento de Morfologia – Faculdade de Odontologia – FEB – 14783-226 – Barretos – SP.

*** Estagiário de Histologia e Embriologia – Departamento de Morfologia – Faculdade de Odontologia – FEB – 14783-226 – Barretos – SP.

luentes nas sociedades industrializadas que desempenham um importante papel na saúde humana, e a eles têm sido atribuídas propriedades teratogênicas as quais redundam na ocorrência de malformações congênitas experimentalmente obtidas em animais de laboratório.^{5,6} O aumento numérico de operárias na indústria do níquel causa inquietação pela possibilidade de toxicidade fetal associada à exposição aos compostos desse elemento químico durante o período de gestação.

Foi demonstrado que o níquel, administrado em ratas prenhes,^{11,18,27} ocasiona vários tipos de alterações do desenvolvimento, o mesmo acontecendo em camundongos fêmeas prenhes.¹⁰

Em relação ao cloreto de níquel, uma dose única, injetada intraperitonealmente em camundongos fêmeas prenhes, causou diminuição corporal do feto, atraso no processo de ossificação do esqueleto e ainda alta incidência de malformações.¹⁰ A exposição de ratas prenhes a vapores de $\text{Ni}(\text{CO})_4$, no 7º ou no 8º dias de gestação, provocou anoftalmia e microftalmia.^{24,25}

O propósito deste trabalho foi verificar o efeito do cloreto de níquel administrado intraperitonealmente, durante o período de gestação, sobre o fechamento do palato em filhotes de camundongos.

Material e método

Camundongos fêmeas (*Mus musculus*), albinas, foram acasaladas com machos da mesma espécie com aproximadamente 60 dias de idade e a identificação do *plug* vaginal indicou o dia zero da gestação.

Os cuidados com os camundongos foram tomados diariamente e os animais tratados com ração granulada e água à vontade.

Os animais foram divididos em dois grupos: grupo controle e grupo tratado.

Grupo controle

Os camundongos fêmeas do grupo controle, no 10º dia de gestação, receberam uma única injeção intraperitoneal de soro fisiológico em volume correspondente ao administrado aos animais do grupo tratado.

Os animais do grupo controle foram sacrificados no 16º dia de gestação, logo após o nascimento ou aos 3 dias de idade; o sacrifício foi feito por deslocamento cervical.

Grupo tratado

Os camundongos fêmeas pertencentes ao grupo dos animais tratados receberam uma injeção intraperitoneal de 30 mg de cloreto de níquel por quilograma de peso corporal do animal.

As fêmeas prenhes foram injetadas com cloreto de níquel no 10^o dia de gestação.

Os animais foram sacrificados no 16^o dia de gestação, ao nascimento ou aos 3 dias de idade; os sacrifícios foram feitos por deslocamento cervical.

Após o sacrifício, os animais foram fixados em solução de formol a 10% e decapitados, e as cabeças foram submetidas à descalcificação em ácido fórmico e citrato de sódio em partes iguais.¹⁵ Após a descalcificação, por cerca de 15 dias com 3 trocas da solução descalcificadora, as cabeças foram reduzidas a segmentos contendo a área para estudo e incluídas em parafina de modo a fornecerem cortes frontais. Essas peças foram submetidas à microtomia e coradas pelo método da hematoxilina e eosina para exame em microscopia de luz. Foi considerada como elemento referencial para análise dos cortes histológicos a presença dos germes dentais dos molares e dos globos oculares.

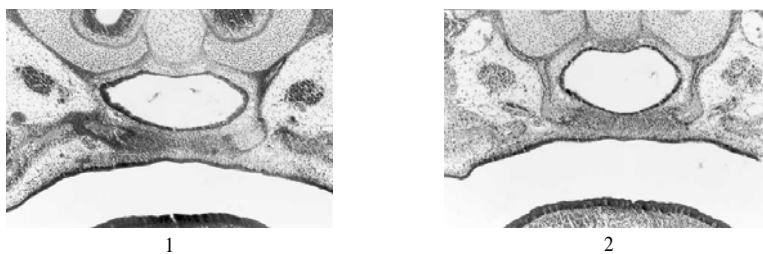
Resultado

Grupo Controle

Animais com 16 dias de vida intra-uterina

Aos 16 dias de vida intra-uterina, o palato dos filhotes do grupo controle apresentou-se fechado completamente, com tecido epitelial pavimentoso estratificado delgado, do lado da cavidade bucal e tecido epitelial pseudo-estratificado cilíndrico ciliado do lado da cavidade nasal. Em razão do nível de corte, identificava-se a presença de tecido conjuntivo ricamente celularizado na área central do palato, isto é, na linha de fusão, sem, entretanto, identificar-se a presença de tecido epitelial. De ambos os lados da linha média, a uma certa distância desta, havia o início da formação de tecido ósseo proveniente das porções laterais aos processos palatinos. A formação do tecido ósseo situava-se a meia distância entre a linha média e extremidade lateral do palato; não havia reminiscência das células epiteliais de revestimento das cristas palatinas.

Por causa da profundidade de corte, podia-se verificar a presença de um espaço entre as estruturas próprias do palato e o septo nasal, ou haver uma justaposição entre as partes dessas duas estruturas. Os tecidos epiteliais de revestimento das superfícies bucal e nasal, ao nível do palato, eram contínuos na sua plenitude e completamente independentes do tecido conjuntivo (ectomesenquimal) situado entre eles (Figuras 1 e 2).



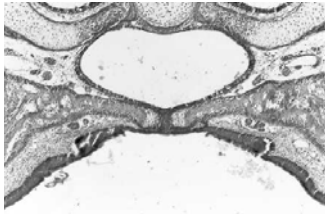
FIGURAS 1 e 2 – Cortes frontais de cabeças de fetos de animais controle mostrando o palato aos 16 dias de vida intra-uterina. HE. 100X.

Animais recém-nascidos

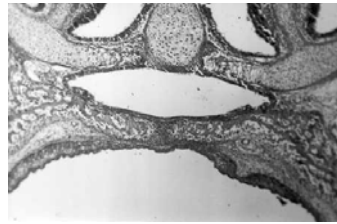
O palato, nessa idade de desenvolvimento, apresentava-se diferente em suas características em relação às encontradas por ocasião da sua análise aos 16 dias de vida intra-uterina.

Como ele já estava fechado naquela idade, apenas puderam-se verificar as seguintes características ao nascimento: os epitélios de revestimento tanto da superfície bucal (pavimentoso estratificado queratinizado) quanto da superfície nasal (pseudo-estratificado cilíndrico ciliado) estavam presentes com suas características confirmadas, mais espesso o do lado bucal; ao nível da linha média, identificava-se uma área de grande concentração celular, aparentemente proveniente de uma proliferação originada da região subepitelial e também, principalmente, da região periostal; o tecido conjuntivo mediano estava nitidamente separado dos tecidos epiteliais de revestimento, tanto do lado do palato quanto do lado das fossas nasais; de ambos os lados dessa concentração celular mediana, que era razoavelmente larga, identificava-se uma faixa de tecido ósseo imaturo, com células jovens e matriz intercelular delicada; mais lateralmente, estava presente tecido ósseo esponjoso, mais maduro, que se estendia, lateralmente, por toda a largura do palato. Ao nível da linha média, os tecidos conjuntivo e ósseo e os epiteliais de revesti-

mento estavam justapostos, e, à medida que se distanciava da linha média, aumentava a quantidade de tecido conjuntivo frouxo entre o osso e as estruturas de revestimento e/ou circundantes (Figuras 3 e 4).



3



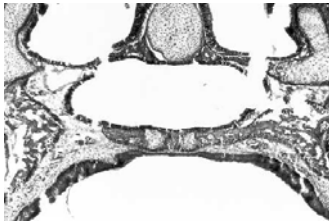
4

FIGURAS 3 e 4 – Cortes frontais de cabeças de animais controle mostrando o palato ao nascimento. HE. 100X.

Animais com 3 dias de idade

Aos 3 dias de idade, o palato dos animais do grupo controle apresentava-se com uma área central de tecido conjuntivo muito celularizada ao nível da linha média.

Revestindo as superfícies do palato, identificava-se a presença de tecidos epiteliais pavimentoso estratificado, espesso do lado bucal e pseudo-estratificado cilíndrico ciliado do lado das fossas nasais. O tecido conjuntivo situado na região da área central do palato estava nitidamente separado dos epitélios de revestimento das superfícies palatinas e das fossas nasais. De ambos os lados desse tecido conjuntivo da área central, embora com pequenas variações, pôde-se identificar a presença de tecido ósseo jovem, com células grandes e substância intercelular em início de mineralização, seguido de tecido ósseo mais maduro com espaços medulares de vários tamanhos. Perto da linha média, os tecidos epiteliais estavam muito próximos dos tecidos conjuntivo mediano e ósseo; à medida que se distanciava da linha média do palato, havia maior quantidade de tecido conjuntivo frouxo entre as superfícies ósseas e os tecidos epiteliais de revestimento. A faixa de tecido conjuntivo na linha média do palato mostrava-se, na maioria dos casos, mais estreita do que nos animais à época do nascimento (Figuras 5 e 6).



5



6

FIGURAS 5 e 6 – Cortes frontais de cabeças de animais controle mostrando o palato aos três dias de idade. HE. 100X.

Grupo Tratado

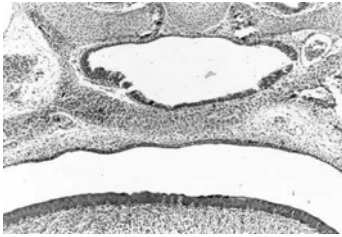
Animais com 16 dias de vida intra-uterina

Aos 16 dias de vida intra-uterina, o palato dos animais do grupo tratado com cloreto de níquel encontrava-se fechado, sem a presença de células epiteliais remanescentes das células de revestimento dos processos palatinos e revestido por tecidos epiteliais típicos para as superfícies bucal ou nasal. Esses epitélios eram contínuos em sua extensão e delgado na superfície bucal. A área central do palato apresentava-se com tecido conjuntivo sem solução de continuidade. Os limites entre os tecidos conjuntivos que havia proporcionado a mesodermização do palato e os epitélios de revestimento eram nítidos. A alguma distância da linha média, próximo às extremidades laterais do palato, de ambos os lados, podia-se identificar o início do processo de ossificação (Figuras 7 e 8).

Animais recém-nascidos

O palato dos animais recém-nascidos apresentava-se, embora com pequenas variações, com uma área central composta por tecido conjuntivo bastante celularizado cuja procedência parecia ser do tecido conjuntivo subepitelial, mas, principalmente, do periósteo vizinho. Esse tecido conjuntivo estava completamente separado dos tecidos epiteliais de revestimento tanto do lado do palato (tecido epitelial pavimentoso estratificado), que era razoavelmente espesso, quanto do lado das fossas nasais (tecido epitelial pseudo-estratificado cilíndrico ciliado). De ambos os lados do tecido conjuntivo mediano, encontrava-se uma área de tecido ósseo em formação com

células grandes e substância intercelular delgada; lateralmente a essas estruturas havia tecido ósseo esponjoso mais maduro com espaços medulares de vários tamanhos, o qual se estendia por toda a largura do palato. Ao nível da linha média, os tecidos epiteliais de revestimento de ambas as superfícies do palato estavam muito próximos do tecido conjuntivo multicelularizado e do tecido ósseo. À medida que se afastava da linha média, aumentava a quantidade de tecido conjuntivo interposto entre o tecido ósseo em formação e as superfícies epiteliais (Figuras 9 e 10).

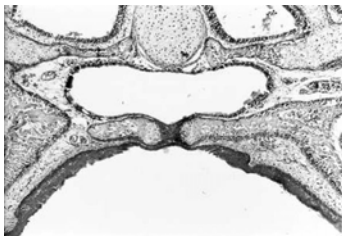


7

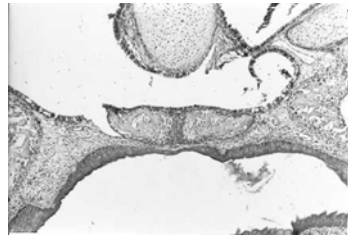


8

FIGURAS 7 e 8 – Cortes frontais de cabeças de fetos de animais tratados mostrando o palato aos 16 dias de vida intra-uterina. HE. 100X



9



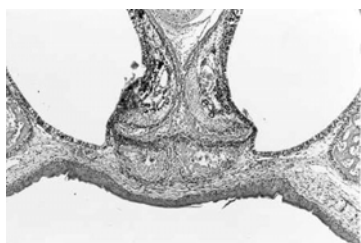
10

FIGURAS 9 e 10 – Cortes frontais de cabeças de animais tratados mostrando o palato ao nascimento. HE. 100X.

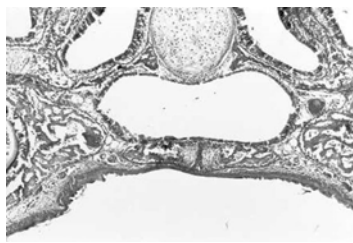
Animais com 3 dias de idade

Aos 3 dias de idade, os animais do grupo tratado apresentavam o palato com uma área central, na linha média, constituída por uma faixa estreita rica em células conjuntivas. Revestindo as superfícies do palato, identificava-se a presença de tecido epitelial tanto do lado bucal (pavimentoso estratifica-

do), espesso, quanto das fossas nasais (epitélio pseudo-estratificado cilíndrico ciliado). Esses tecidos epiteliais estavam nitidamente separados e eram distintos dos tecidos situados entre eles. De ambos os lados do tecido conjuntivo situado na linha média, havia uma faixa de tecido ósseo jovem, com células volumosas e pouca substância intercelular; lateralmente a esse tecido, havia tecido ósseo esponjoso, mais maduro, com espaços medulares de vários tamanhos; o tecido ósseo estendia-se, lateralmente, por toda largura do palato; na região central, os tecidos epiteliais de revestimento estavam próximos tanto do tecido conjuntivo mediano quanto do tecido ósseo paratateral. À medida que se distanciava da linha média, aumentava a quantidade de tecido conjuntivo entre o tecido ósseo do palato e os tecidos de revestimento. Em razão da profundidade do nível do corte, apareceram variações em relação à descrição padrão mencionada (Figuras 11 e 12).



11



12

FIGURAS 11 e 12 – Cortes frontais de cabeças de animais tratados mostrando o palato aos 3 dias de idade. HE. 100X.

Discussão

O palato secundário resulta do crescimento das bordas mediais dos processos maxilares que se fundem uma com a outra, no sentido ântero-posterior, acima da língua^{2,12,17} e também com o palato primário^{1,8,12,17} e, ainda, com o septo nasal.^{1,13} Quando as duas prateleiras palatinas se encontram, há a adesão dos epitélios, e uma linha de união epitelial se forma ao nível da linha média; para a fusão das prateleiras palatinas ocorrer, é necessária a eliminação da sua cobertura epitelial,²⁵ de modo que os epitélios aderentes e suas lâminas basais se rompem e são substituídos pelo mesênquima,² isto é, os núcleos do mesênquima dos dois processos palatinos coalescem;¹² o osso membranoso estende-se para dentro dos processos palatinos laterais para formar o palato duro.¹³

Falhas na sincronização dos movimentos e do crescimento das cristas palatinas podem afetar o fechamento normal do palato,⁸ pois a base embriológica da fenda palatina é a falta de encontro e fusão das massas mesodérmicas dos processos palatino e lateral com um septo nasal e/ou com o processo palatino mediano do palato primário;^{13,14} drogas anticonvulsivantes administradas durante a gravidez aumentam o risco de fenda palatina.¹⁷ Com exceção da base, o crânio cresce por crescimento sutural que é um mecanismo primário e ativo ao nível das suturas e não um mecanismo secundário de ajuste.²⁰ As atividades dos campos de crescimento residem no tecido mole do periosteio e do endosteio e não na parte dura do osso, uma vez que as membranas e outros tecidos moles que recobrem o osso produzem e controlam o crescimento ósseo em resposta a um complexo de sinais provenientes do funcionamento e crescimento de músculos e de outros órgãos e tecidos que ativam os osteoblastos e osteoclastos.⁴ O crescimento sutural é iniciado por uma proliferação do tecido conjuntivo da sutura que possui três camadas distintas: as zonas em contato com os ossos vizinhos consistem de tecido conjuntivo denso e a camada média, muito mais rica em células que as camadas periféricas, na qual ocorre proliferação celular, produção de novas fibras e de sua disposição funcional.²⁰ Enquanto a aposição de novo osso nas superfícies suturais aumenta os ossos individualmente,⁴ o crescimento na sutura palatina mediana provê um local para o ajuste do diâmetro transversal da face em crescimento.²⁰

Os resultados encontrados neste trabalho mostram que, tanto nos animais controle quanto nos animais tratados, houve uma evolução no processo de formação e desenvolvimento do palato secundário compatível com os dados da literatura, pois não só as prateleiras palatinas estavam fusionadas, como havia ocorrido a mesodermização na linha de fusão com o conseqüente desaparecimento das células epiteliais de revestimento das superfícies mediais das prateleiras palatinas já aos 16 dias de vida intra-uterina. Além disso, os tecidos epiteliais estavam diferenciados e eram típicos para as superfícies nasal ou bucal que revestiam.

A discrepância entre os resultados encontrados para os animais do grupo tratado quando comparados aos do grupo controle, aos 16 dias de vida intra-uterina, foi uma formação óssea retardada, reversível, ao nível do palato. Essa observação corrobora os achados de ocorrência de atraso na ossificação fetal pelo emprego, por via intraperitoneal, embora de cloreto de zinco, na dose de 2 mg/kg de peso corporal, nos dias 8, 9, 10 ou 11 da gestação em camundongos³ e também os de ausência do aumento de malformações pela administração intravenosa de 2 mg/kg de peso corporal de cloreto de zinco no 8º dia de gestação em *hamsters*.⁶

Paralelamente ao efeito causado pelo cloreto de zinco e descrito como malformação do desenvolvimento,³ é descrita a ocorrência de fenda palatina em camundongos pelo emprego de corticosterona do 11^o ao 14^o dias de gestação e na razão diretamente proporcional à dose empregada⁷ ou atraso no processo de fusão sem impedi-lo;^{9,19} da mesma forma, substâncias latirogênicas ingeridas por camundongos fêmeas grávidas determinaram alterações do desenvolvimento dos filhotes, inclusive fendas palatinas,²² observações que não encontram apoio nos resultados encontrados neste trabalho.

Os resultados encontrados neste trabalho corroboram, por sua vez, as observações de ausência de defeitos pelo uso, em estudos com embriões de galinha, de sal de cloreto de níquel na dose de 0,2 mg no 4^o dia de incubação.¹⁶ Por outro lado, foi encontrado um aumento tanto no número de animais recém-nascidos de tamanho reduzido pela adição de 5 ppm¹⁸ quanto de redução de ganho de peso das mães e aumento de mortes perinatais de filhotes pela administração de 250 ppm de cloreto de níquel na água de beber;²¹ peso corporal médio de fetos de ratos reduzido significativamente foi também relatado ante a administração, no 10^o dia de gestação, por via intraperitoneal, de 30 mg/kg de peso corporal de cloreto de níquel e analisado no 20^o dia de gestação, sem, entretanto, causar malformações,²⁶ com o que nossos resultados estão de acordo.

Os efeitos embriotóxicos e teratogênicos do cloreto de níquel foram descritos em estudos realizados com camundongos,¹⁰ com ratos^{11,23,24} e com *hamsters*,⁵ podendo ocasionar morte fetal, crescimento retardado, reabsorções fetais e malformações de diversos tipos. Embora sem encontrar malformações, como já mencionado, em ratos tratados com cloreto de níquel com dose idêntica à utilizada neste trabalho,²⁶ com o que nossos resultados concordam, é relatado que o crescimento intra-uterino e o peso dos fetos eram menores nos animais tratados quando comparados ao dos animais controle, fato também relatado em outros estudos realizados com ratos^{11,23,24} ou com camundongos.¹⁰

Alterações graves do desenvolvimento como anoftalmia ou microftalmia produzidas em fetos de ratos pela exposição a 0,08 a 0,3 mg de carbonil níquel por litro de ar, por 15 minutos, no 7^o ou no 8^o dia de gestação²³ ou como crianças anencefálicas ou meningomielocelos são relatadas na literatura e relacionadas à concentração significativamente elevada de zinco no cordão umbilical,²⁷ não encontram suporte em nossas observações.

Atraso no processo de ossificação fetal, ante uma dose única, intraperitoneal, de cloreto de níquel já foi relatada,¹⁰ sem, entretanto, fazer menção à reversibilidade desse processo retardado, além de estar associado a uma alta incidência de malformações, com o que nossos resultados não concordam.

Os resultados encontrados neste trabalho permitem admitir que o cloreto de níquel administrado intraperitonealmente atravessa a barreira placentária e interfere no processo de ossificação fetal, o que, aliás, é opinião comum entre os autores.^{5,10,11,24}

Deve ser salientado, também, que a ocorrência de malformações do desenvolvimento é relatada em muitos casos, mas não pode ser descartada a descrição de ausência desse tipo de anomalia do desenvolvimento em condições estritamente iguais às utilizadas neste trabalho.²⁶

Nenhum autor, também, faz menção à reversibilidade do processo retardado como verificado em nossos resultados. Outra observação que merece destaque é a análise da linha de junção das cristas palatinas que se mostraram plenamente fusionadas com a persistência na linha média de uma faixa de células que continua demarcando, pela sua posição, a região de fusão⁸ que, entretanto, pelas suas características histológicas e pelas modificações que apresenta nas suas superfícies laterais, deve ser considerada, como realmente ela é, uma área de crescimento sutural.^{4,20}

Conclusão

Nas condições experimentais deste trabalho, com base nos resultados encontrados, pode-se concluir que o cloreto de níquel interfere de maneira reversível no processo de ossificação do palato sem causar malformações aparentes.

Agradecimento

Os autores são gratos à Fapesp pela concessão de bolsa de iniciação científica orientada pelo Prof. Sebastião Hetem (Proc. nº 98/12909-1) e ao Prof. Dr. Raphael Carlos Comelli Lia pela colaboração na realização da documentação fotográfica.

HETEM, S. et al. Effect of nickel chloride on palate closure. *Rev. Odontol. UNESP (São Paulo)*, v. 31, n.2, p.285-298, 2002.

- **ABSTRACT:** Female mice were injected with 30 mg/kg of body weight with nickel chloride at the day 10 of pregnancy. The animals were sacrificed at day 16 of ges-

tation, at birth or 3 days old. Pieces comprising the palatal area were prepared for light microscope analysis. The results showed the palate shelves fused at the 16th day of gestational period, typical epithelia covering the nasal and buccal surfaces, connective tissue at the fusion region and bony tissue more conspicuous and near of the midle line in the control animals than in the treated ones. On the other observation periods, all the characteristics were indistinguishable between control and treated animals. Thus, it was concluded that nickel chloride reversibly delays the ossification process of the palate.

- **KEYWORDS:** Palate; nickel chloride; palate fusion; teratogenicity.

Referências bibliográficas

- 1 AVERY, J. K. *Oral development and histology*. Stuttgart: Thieme, 2001. p.30-1.
- 2 BHASKAR, S. N. *Histologia e embriologia oral de Orban*. São Paulo: Artes Médicas, 1989. p. 8-10.
- 3 CHANG,C-H., MANN, D. E., GAUTIERI, R. F. Teratogenicity of zinc chloride, 1, 10-phenanthroline and zinc-1,10-phenanthroline complex in mice. *J. Pharm. Sci. (New York)*, v.66, n.12, p.1755-8, Dec. 1977 apud SHEPARD, T. H. *Catalog of teratogenic agents*. 9th ed. Baltimore: Johns Hopkins, 1998. p.490.
- 4 ENLOW, D. H. *Crescimento facial*. 3.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1993. p.36-7.
- 5 FERM, V. H. The teratogenic effects of metals on mammalian embryos. *Adv. Teratology*, v.5, p.51-75, 1972.
- 6 FERM, V. H., CARPENTER, S. J. Teratogenic effect of cadmium and its inhibition by zinc. *Nature (London)*, v.216, n.120, p.1123, Dec. 1967 apud SHEPARD, T. H. *Catalog of teratogenic agents*. 9th ed. Baltimore: Johns Hopkins, 1998. p. 490.
- 7 HACKMAN, R. M., BROWN, K. S. Corticosterone induced isolated cleft palate in A/J mice. *Teratology (New York)*, v.6, n.3, p.313-6, Dec. 1972.
- 8 KATCHBURIAN, E., ARANA, V. *Histologia e embriologia oral*. Texto-atlas-correlações clínicas. São Paulo: Panamericana, 1999. p.13-5.
- 9 LATHI, A., ANTILA, E., SAXEN, L. The effect of hydrocortisone on the closure of the palatal shelves in two inbred strains of mice *in vivo* and *in vitro*. *Teratology (New York)*, v.6, n.1, p.37-41, Aug. 1972.
- 10 LU, C. C. et al. Teratogenic effects of nickel chloride on embryonic mice and its transfer to embrionic mice. *Teratology (New York)*, v.19, n.2, p.137-42, Apr. 1979.

- 11 MAS, A., HOLT, D., WEBB, M. The acute toxicity and teratogenicity of nickel in the pregnant rat. *Toxicology, (Limerick)* v.35, n.1, p.45-47, Apr. 1985.
- 12 MJÖR, I. A., FEJERSKOV, O. *Embriologia e histologia oral humana*. São Paulo: Panamericana, 1990. p.20-2.
- 13 MOORE, K. L. *Embriologia clínica*. Rio de Janeiro: Interamericana, 1975. p.149-61.
- 14 _____. *Embriologia básica*. Rio de Janeiro: Interamericana, 1976. p.124.
- 15 MORSE, A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bone for sectioning in paraffin. *J. Dent Res. (Washington)*, v.24, n.3/4, p.143-53, June-Aug. 1945.
- 16 RIDGWAY, L. P., KARNOFSKY, D. A. The effects of metals on the chick embryo: toxicity and production of abnormalities in development. *Ann. N. Y. Acad. Sci. (New York)*, v.55, p.203-15, 1952.
- 17 SADLER, T. W. *Langman embriologia médica*. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 208-12.
- 18 SCHROEDER, H. A., MICHENER, M. Toxic effects of trace elements on the reproduction of mice and rats. *Arch. Environ. Health (Washington)*, v.23, n.2, p.102-6, Aug. 1971.
- 19 SHAH, R. M., CHAUDHRY, A. P. Hydrocortisone-induced cleft palate in hamsters. *Teratology (New York)*, v.7, n.2, p.191-4, Apr. 1973.
- 20 SICHER, H., DU BRUL, E. L. *Oral anatomy*. 5.ed. St. Louis: Mosby, 1970. p.86-101.
- 21 SMITH, M. K. et al. Perinatal toxicity associated with nickel chloride exposure. *Environ. Res. (New York)*, v.61, n.2, p.200-11, May 1993.
- 22 STEFFEK, A. J., VERRUSIO, A. C., WATKINS, C. A. Cleft palate in rodents after maternal treatment with various lathyrogenic agents. *Teratology (New York)*, v.5, n.1, p.33-8, Feb. 1972.
- 23 SUNDERMAN, F. W. et al. Eye malformations in rats: Induction by prenatal exposure to nickel carbonyl. *Science (Washington)*, v.203, n.4380, p.550-3, Feb. 1979.
- 24 _____. Embryotoxicity and fetal toxicity of nickel in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol. (New York)*, v.43, n.2, p.381-90, Feb. 1978.
- 25 TEN CATE, A. R. *Oral histology: development, structure and function*. 5.ed. St. Louis: Mosby. 1998. p.33-7.
- 26 YIOMASA, M. M. *Estudo morfológico, morfométrico e estereológico das alterações presentes na língua de fetos de ratos sob ação do níquel*. Ribeirão Preto, 1995. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.

- 27 ZIMMERMAN, A. W. Hyperzincemia in anencephaly and spina bifida. A clue to the pathogenesis of neural tube defects? *Neurology (Minneapolis)*, v.34, n.4, p.443-50, Apr. 1984 apud SHEPARD, T. H. *Catalog of teratogenic agents*. 9th ed. Baltimore: Johns Hopkins, 1998. p. 490.