

Efeito do Cloreto de Níquel sobre o Desenvolvimento do Germe Dental de Molares e do Processo Alveolar

Sebastião HETEM^a, Simone Salgado Barone MARQUES^a,
Celina Antonio PRATA^b, Carla de Jesus Almeida SCAPINELLI^c

^a Departamento de Morfologia, Faculdade de Odontologia, FEB
14780-226 Barretos - SP

^b Estagiária, Departamento de Morfologia, Faculdade de Odontologia, FEB
14780-226 Barretos - SP

^c Monitora, Departamento de Morfologia, Faculdade de Odontologia, FEB
14780-226 Barretos - SP

HETEM, S.; MARQUES, S.S.B.; PRATA, C.A.; SCAPINELLI, C.J.A. Effect of nickel chloride on molar tooth germ and alveolar bone development. **Rev. Odontol. UNESP**, São Carlos, v. 32, n. 1, p. 67-73, Jan/Jun 2003.

Resumo: Camundongos fêmeas receberam injeção de 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 e aos 3 dias de idade. As cabeças foram incluídas em parafina, de modo a fornecerem cortes frontais e corados para análise histológica. Os resultados mostraram, no 16^o dia de gestação, semelhança nas estruturas morfológicas dos órgãos dentais dos animais controles e tratados e atraso na formação óssea do processo alveolar. Nos demais períodos de observação não houve diferenças observáveis tanto no desenvolvimento dos germes dentais quanto do processo alveolar entre os dois grupos de animais. Conclui-se que o cloreto de níquel atrasa, reversivelmente, o desenvolvimento e a ossificação do processo alveolar, sem interferir no desenvolvimento dos germes dentais.

Palavras-chave: *Germe de dente; processo alveolar; cloreto de níquel; ossificação; teratogenicidade.*

Abstract: Female mice were injected with 30 mg/kg of body weight with nickel chloride on day 10 of pregnancy. The animals were sacrificed at day 16 of gestation, at birth or 3 days old. The heads were prepared for light microscope analysis. The results showed no differences of tooth germs development at the 16th day of gestational period from animals of both control and treated groups but there was seen a delay of alveolar bone formation of the treated group animals. On the other periods under analysis, there was not found any differences either on tooth germ development or of alveolar bone formation in both groups of animals. Thus it was concluded that nickel chloride does not interfere with tooth germ development but, reversibly delays the ossification process of the alveolar bone.

Keywords: *Tooth germ; alveolar process; nickel chloride; ossification; teratogenicity.*

Introdução

O cloreto de níquel, um composto químico contendo um metal pesado, tem se mostrado capaz de interferir no desenvolvimento embrionário quando injetado em animais prenhes, atravessando a barreira placentária e atingindo o feto em fases tardias da gestação.^{11,13,15,22,28,29}

Fatos semelhantes a esse têm sido alvo de grande preo-

cupação para a saúde pública que busca a relação entre poluição ambiental e intoxicação por metais pesados, uma vez que estes provocam uma variedade de malformações, experimentalmente, em animais de laboratório.^{3,4}

A administração de cloreto de níquel a animais prenhes ocasiona desorganização da camada basal do epitélio das

regiões dorsal e ventral da língua dos filhotes, evidenciando interferência no desenvolvimento das papilas linguais na região dorsal. Além disso os resultados mostram que os fetos tratados são de menor tamanho e menos desenvolvidos que os controles,¹¹ e que apresentam germes dentais com alterações profundas²². A administração desse composto atrasa o processo de desenvolvimento do palato, retardando, reversivelmente, o processo de ossificação.¹⁰

O desenvolvimento do germe dental tem sido estudado procurando-se verificar o efeito de diversas substâncias administradas intraperitonealmente sobre sua evolução.^{8,9,16,17,19}

Assim foi demonstrado que a ivermectina não produziu efeito deletério sobre o desenvolvimento do germe dental,¹⁹ bem como a tetraciclina⁸ ou a aminoacetonitrila.⁹

Por outro lado, foi demonstrado que a ciclofosfamida retarda o desenvolvimento do germe dental na razão diretamente proporcional à dose empregada.^{16,17}

O propósito deste trabalho foi verificar o efeito do cloreto de níquel administrado durante o período de gestação sobre o desenvolvimento do germe dental de molares e do tecido ósseo do processo alveolar.

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 de gestação.

Os cuidados com os animais 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

Camundongos fêmeas do grupo controle, no 10º (décimo) 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 caso das mães prenhes, no 16º dia de gestação, ou, dos filhotes logo após o nascimento ou, ainda, aos 3 dias de idade. O sacrifício foi feito por deslocamento cervical.

Grupo Tratado

Camundongos fêmeas pertencentes ao grupo dos animais tratados receberam uma injeção intraperitoneal de 30 mg de cloreto de níquel por quilograma de sua massa corporal no 10º dia de gestação.

Os animais foram sacrificados no 16º dia de gestação, no caso dos animais prenhes, ou ao nascimento ou aos três

dias de idade, no caso dos filhotes. Os sacrifícios foram feitos por deslocamento cervical.

Após o sacrifício, os filhotes foram decapitados e as cabeças fixadas em solução de formol a 10%. A seguir, as cabeças foram submetidas à descalcificação em ácido fórmico e citrato de sódio em partes iguais.¹⁸ 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.

Resultado

Animais Controle

16 dias de vida intra-uterina

Os germes dentais dos molares superiores e inferiores encontravam-se na fase de campânula em seu estágio de desenvolvimento.

Mostravam todas as estruturas constituintes, compreendendo a lâmina dental, os epitélios interno e externo, o retículo estrelado e início da diferenciação do estrato intermediário no órgão do esmalte, a papila dental como uma massa celular altamente condensada com início de diferenciação dos odontoblastos na periferia e o delineamento das estruturas do saco dental.

Envolvendo o germe dental, encontrava-se tecido ósseo da cripta alveolar, que era espesso e estendia-se lateralmente e parcialmente sobre a sua superfície oclusal (Figura 1).

Ao Nascimento

Os germes dentais dos molares apresentavam-se bem constituídos, com todas as suas estruturas presentes. Podia-se notar, tanto no molar superior (Figura 2) quanto no molar inferior (Figura 3), a presença de ameloblastos diferenciados e dos demais elementos estruturais do órgão do esmalte. Do lado da papila dental, os odontoblastos estavam completamente diferenciados em toda a extensão da sua superfície, e a mesma constituía-se por um aglomerado de células densamente dispostas e uniformemente distribuídas. Entre as camadas de ameloblastos e odontoblastos, pôde-se identificar a presença de uma delgada camada de esmalte depositada ao nível das superfícies oclusais das cúspides e de uma camada de dentina, não só mais espessa como também mais extensa, revestindo praticamente toda a superfície da papila dental. Perifericamente ao órgão do esmalte, identificava-se uma delgada estrutura de tecido conjuntivo, representante do folículo dental, que o separava do osso alveolar em formação, constituído por osso esponjoso com vários espaços medulares e que envolvia o órgão dental em

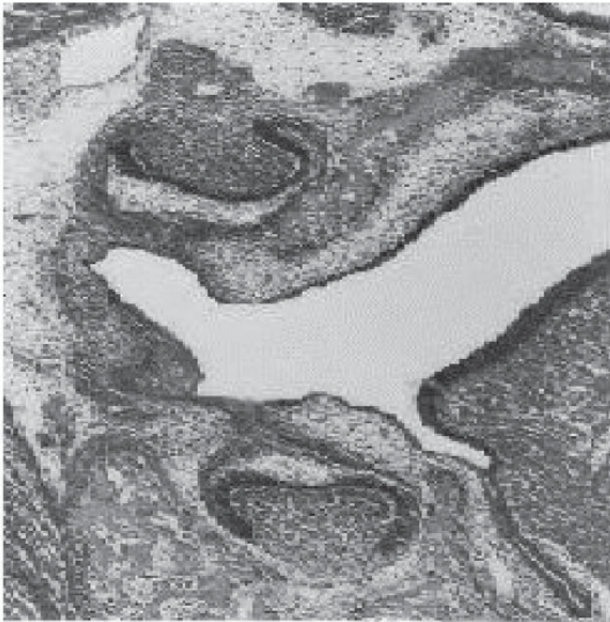


Figura 1. Corte frontal de cabeça de feto do grupo controle com 16 dias de vida intra-uterina, mostrando os germes dentais dos primeiros molares superiores e inferiores e o desenvolvimento do osso do processo alveolar. HE. 100×

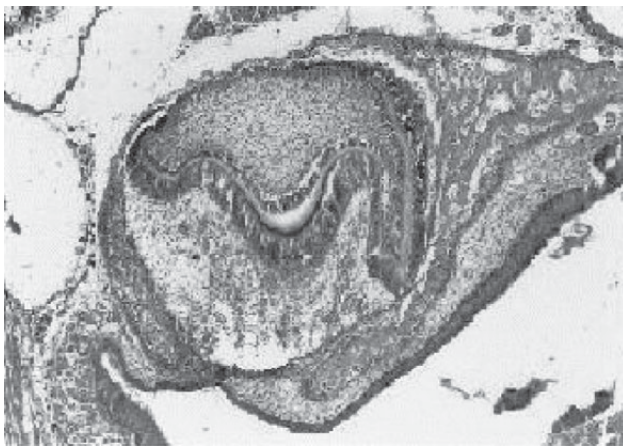


Figura 2. Corte frontal de cabeça de animal do grupo controle recém-nascido mostrando germe dental de 1 molar superior e as estruturas em desenvolvimento do osso alveolar. HE. 100×

desenvolvimento em sua maior parte, exceto no centro de sua região oclusal.

3 dias de idade

Os germes dentais mostravam-se evoluídos em relação ao tempo anterior, apresentando órgão do esmalte todas as camadas peculiares, com os ameloblastos altos completamente diferenciados em toda a extensão da superfície da



Figura 3. Corte frontal da cabeça de animal recém-nascido do grupo controle mostrando o germe dental de molar inferior e as estruturas do osso alveolar em desenvolvimento. HE. 100×

coroa. Do lado da papila dental, os odontoblastos revestiam-na, estavam diferenciados e a papila mostrava-se composta por um aglomerado de células semelhantes e uniformemente distribuídas.

A camada de esmalte estendia-se por toda a superfície da coroa, exceto nas áreas onde normalmente não ocorre. A camada de dentina estendia-se também por toda a extensão da coroa. Ambos eram mais espessos na altura da superfície das cúspides e diminuiam sua espessura em direção cervical.

O tecido do saco dental era delgado e revestia o germe dental separando-o do tecido ósseo esponjoso do processo alveolar. Esse tecido ósseo recobria todo o órgão dental, exceto no centro da superfície oclusal.

Animais Tratados

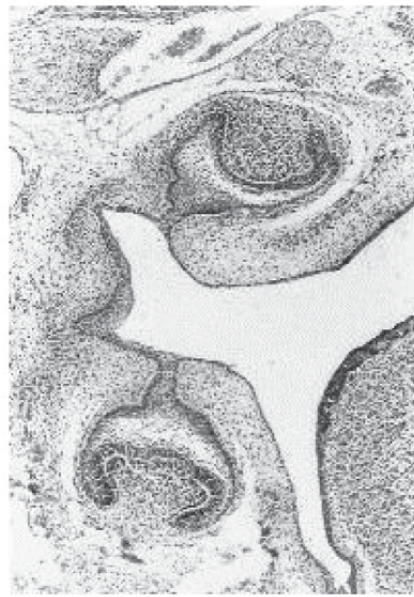
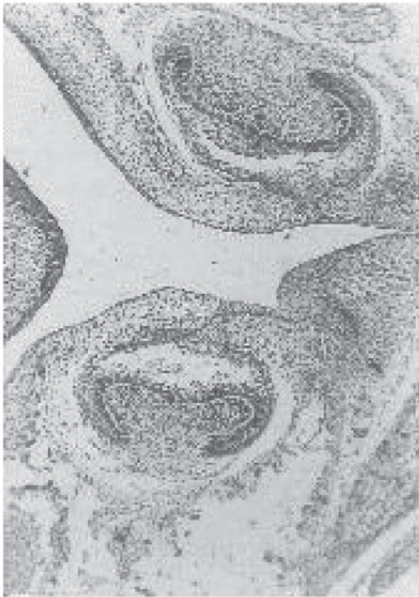
16 dias de vida intra-uterina

Os germes dentais apresentavam-se na fase de câmpula, com todas as suas estruturas constituintes, evidenciando-se a lâmina dental, os epitélios interno e externo, o retículo estrelado e o estrato intermediário no órgão do esmalte, a papila dental como uma condensação intensa de células com início de diferenciação dos odontoblastos na sua periferia e o delineamento do saco dental.

As estruturas do osso alveolar estavam ausentes ou apenas incipientes, não se evidenciando a presença de tecido ósseo nas cercanias do germe dental (Figuras 4 e 5).

Ao nascimento

Os germes dentais mostravam-se constituídos por todas as suas camadas típicas, com ameloblastos completamente diferenciados ao nível das pontas das cúspides e menos desenvolvidos nas áreas mais afastadas delas. Do lado da papila



Figuras 4 e 5. Cortes frontais de cabeças de fetos do grupo tratado aos 16 dias de vida intra-uterina mostrando germes dentais de molares superiores e inferiores e o desenvolvimento pouco evidente do osso do processo alveolar. HE. 100 \times .



Figura 6. Corte frontal de cabeça de animal recém-nascido do grupo tratado mostrando germe dental de um molar superior e as estruturas do osso alveolar em desenvolvimento. HE. 100 \times .

dental, os odontoblastos não só recobriam a sua superfície periférica como estavam diferenciados nas regiões correspondentes às cúspides e mais atrasados na sua diferenciação à medida que se situavam nas partes inferiores das vertentes das cúspides. Internamente à camada de odontoblastos, a papila dental apresentava-se como uma condensação de células uniformes e semelhantes entre si. Entre os ameloblastos e os odontoblastos, estavam presentes uma delgada camada de esmalte e uma camada de dentina um pouco mais espessa e mais extensa que a camada de

esmalte. Ambos, entretanto, estendiam-se por uma área que recobria grande porção da superfície oclusal.

Circundando o órgão dental em desenvolvimento identificava-se uma delgada camada de tecido conjuntivo, correspondente ao saco dental que o separava de um tecido ósseo esponjoso com vários espaços medulares que o envolvia em grande extensão, exceto ao nível do centro da superfície oclusal (Figura 6).

3 dias de idade

Os germes dentais estavam perfeitamente constituídos, com todas as camadas do órgão do esmalte e estruturas da papila dental. O esmalte estava mais espesso no nível do ápice das cúspides e mais delgado à medida que dele se afastava, e inexistia nas áreas carentes de esmalte típicas do camundongo. A camada de dentina estendia-se por toda a superfície da papila dental, abaixo do esmalte.

As estruturas do saco dental eram delgadas e separavam o órgão dental do osso alveolar em formação que o revestia em grande parte, exceto na região central da superfície oclusal (Figura 7).

Em função do nível do corte, o osso alveolar apareceu revestindo o órgão dental em toda a sua extensão (Figura 8).

Discussão

A busca constante de informações sobre efeitos deletérios produzidos por substâncias poluentes ou potencialmente poluentes nas sociedades industrializadas deve ser a preo-

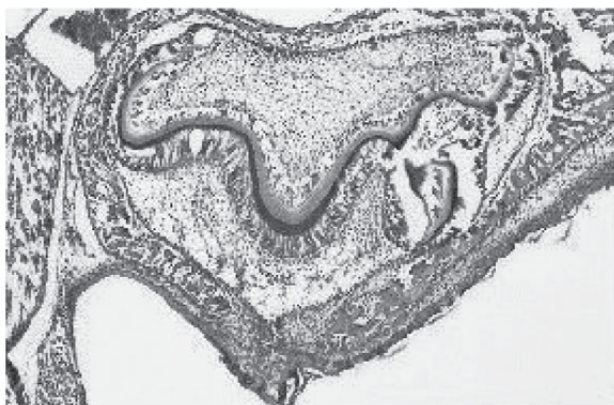


Figura 7. Corte frontal de cabeça de animal do grupo tratado, com 3 dias de idade, mostrando o germe dental de um molar superior em corte fora do centro da coroa, e as estruturas do osso alveolar em desenvolvimento envolvendo todo germe dental. HE. 100x.

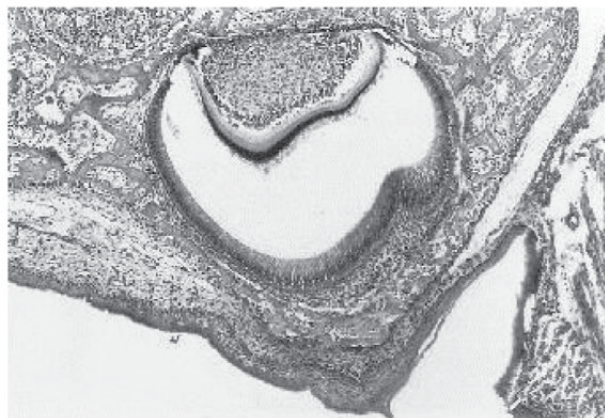


Figura 8. Corte frontal de cabeça de animal do grupo tratado, com 3 dias de idade, mostrando o germe dental de 1 molar superior e as estruturas do osso alveolar em desenvolvimento. HE. 100x.

cupação de todos que militam na área de saúde. Os metais pesados, sérios poluentes das sociedades industrializadas, desempenham importante papel na saúde humana e a eles tem sido atribuída a responsabilidade por várias malformações congênitas em diferentes animais de laboratório,^{14,27} o que causa inquietação devido ao aumento numérico de mulheres operárias na indústria do níquel e, conseqüentemente, à possibilidade de toxicidade fetal pela exposição ao níquel durante a gestação.²⁷ Injetado intraperitonealmente em animais prenhes, o cloreto de níquel não somente atravessa a barreira placentária como provoca uma série de malformações congênitas,^{4,13,27} pois essa substância prejudica a organogênese mesmo em baixa concentração.¹³ Já foi demonstrado que a exposição a concentrações de 0,08 a 0,3 mg de carbonil níquel por litro de ar, por 15 minutos no 7º ou no 8º dia de gestação é capaz de produzir graves alterações sobre o desenvolvimento, como anofthalmia ou microftalmia em fetos de ratos.²⁸

É relatada também a ocorrência de crianças anencefálicas ou meningomieloceles pela concentração significativamente elevada de zinco no cordão umbilical.³⁰ A injeção de cloreto de zinco intraperitonealmente, na dose de 20 mg/kg de peso, nos dias 8,9,10 ou 11 da gestação em camundongos fêmeas prenhes produziu atraso e algumas malformações na ossificação fetal¹, o que não ocorreu com o uso de 2 mg/kg administrado intravenosamente, no 8º dia de gestação, em hamsters.⁵

Além dos efeitos produzidos pelo cloreto de zinco e descritos como malformações do desenvolvimento,¹ há a descrição da ocorrência de fenda palatina em camundongos pelo emprego de corticosterona no 11º ao 14º dia de gestação e na razão diretamente proporcional à dose em-

pregada⁶ ou de atraso no processo de ossificação do palato, sem impedi-lo.^{12,23} Alterações no desenvolvimento dos filhotes, inclusive fendas palatinas, foram também descritas em decorrência da ingestão de substâncias latirogênicas por camundongos fêmeas grávidas.²⁶

Crescimento retardado, morte ou reabsorções fetais e malformações de diversos tipos foram descritos em estudos realizados com o emprego do cloreto de níquel utilizando camundongos,^{13,27} ratos^{14,28,29} ou hamsters.³

Os resultados encontrados neste trabalho falam a favor da ausência de malformações do desenvolvimento relatada em estudo realizado com ratas prenhes tratadas com 30 mg/kg de peso corporal de cloreto de níquel, embora os filhotes tivessem apresentado crescimento intra-uterino e peso menores quando comparados aos dos animais do grupo controle¹¹, fatos também descritos em outros estudos realizados com ratos^{14,21,28,29} ou com camundongos.^{13,27}

As características morfológicas dos órgãos dentais em desenvolvimento encontradas neste trabalho, tanto do grupo controle quanto do grupo tratado, são compatíveis com as descritas na literatura,^{2,7} o que mostra a inobservância de efeitos maléficos do cloreto de níquel sobre o desenvolvimento desses órgãos durante o período embrionário, embora, relatos de profundas alterações do desenvolvimento, quer de órgãos dentários²² quer de papilas linguais¹¹, sejam encontrados na literatura.

Por outro lado, de acordo com nossos resultados, o cloreto de níquel ocasiona, embora de maneira reversível, atraso no desenvolvimento do tecido ósseo do processo alveolar ou da cripta óssea onde se desenvolve o germe dental. Tal observação não somente corrobora os resultados obtidos com o uso de cloreto de níquel que mostraram

atraso no desenvolvimento durante a embriogênese^{11,13,14}, mas, em particular, dos que relatam atraso durante o processo de ossificação do palato, de maneira também reversível¹⁰. Deve ser ressaltado, com o que nossos resultados concordam, que atraso no processo de ossificação fetal ante a uma dose única, intraperitoneal, de cloreto de níquel já foi relatado¹³ sem, entretanto, fazer menção à reversibilidade desse processo retardado. O fato dessa observação estar associada a uma alta incidência de malformações não encontra apoio em nossos resultados. Observe-se também que o sal de cloreto de níquel, usado em estudos com embriões de galinha na dose de 0,2 mg no 4º dia de incubação, não produziu defeitos aparentes²⁰, com o que nossos resultados concordam.

Outros relatos mostraram aumento do número de animais recém-nascidos de tamanho reduzido pela adição de 5 ppm²¹ ou de redução de ganho de peso das mães e aumento de mortes perinatais pela administração de 250 ppm de cloreto de níquel na água de beber²⁵.

Assim, é possível admitir que o cloreto de níquel administrado intraperitonealmente, atravessa a barreira placentária e interfere no processo de ossificação^{3,4,10,13,22,29}; porém, em condições idênticas às utilizadas neste trabalho, não causou qualquer tipo de anomalia do desenvolvimento^{10,11} apesar da ocorrência de malformações ter sido relatada em várias oportunidades.^{13,14,21,29}

Os resultados encontrados neste trabalho mostraram interferência no processo de síntese e de secreção de matriz orgânica dos tecidos mineralizados em função da época e do período de sua administração, o que está a exigir a necessidade de obtenção de mais detalhes sobre seus efeitos, e, chamam particularmente a atenção tendo em vista que foi feita somente uma administração do cloreto de níquel durante o período de gestação e que tais resultados poderão agravar-se na medida em que a exposição a essa substância prolongar-se por mais tempo.

Conclusão

Nas condições experimentais deste trabalho, com base nos resultados encontrados, pode-se concluir que o cloreto de níquel não alterou o processo de desenvolvimento do germe dental mas interferiu retardando de modo reversível o desenvolvimento e a ossificação do processo alveolar.

Agradecimento

Os autores são gratos à FAPESP pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica orientada pelo Prof. Dr. Sebastião Hetem (Proc. 98/12909-1) e ao Prof. Dr. Rafael Carlos Comelli Lia pela colaboração na realização na documentação fotográfica.

Referências

1. 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.**, Easton, v. 66, n. 12, p. 1755-1758, 1977.
2. COHN, S.A Development of the molar teeth in the albino mouse. **Am. J. Anat.**, Philadelphia, v.101, n. 2, p. 295-319, Sept. 1957.
3. FERM, V.H. The teratogenic effects of metals on mammalian embryos. **Adv.Teratology**, v. 5, p. 51-75, 1972.
4. FERM, V.H. Teratogenic effects and placental permeability of heavy metals. **Cur.Topics Pathol.**, Berlin, v. 62, p.145-151, 1976.
5. FERM, V.H.; CARPENTER, S.J. Teratogenic effect of cadmium and its inhibition by zinc. **Nature**, London, v. 216, n. 120, p.1123, 1967.
6. HACKMAN, R.M.; BROWN, K.S. Corticosterone induced isolated cleft palate in A/J mice **Teratology**, New York, v. 6, n. 3, p.313-316, Dec. 1972.
7. HAY, M.F. The development "in vivo" and "in vitro" of the lower incisor and molars of the mouse. **Arch. Oral Biol.**, Oxford, v. 3, p.86-109, Feb. 1961.
8. HETEM, S. Effect of transplacentally acquired tetracycline on tooth germ development. **Rev. Fac. Odontol.**, Araçatuba, v.4, n. 1, p. 23-27, 1975.
9. HETEM, S.; MATHEUS, M.T.G.; DEKON, S.F.C.; Estudo do desenvolvimento de germes dentais de camundongos submetidos à ação transplacentária de aminoacetnitrila. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v.17, n. 1/2, p. 63-72, 1988.
10. HETEM, S. et al. Efeito do cloreto de níquel sobre o fechamento do palato. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 285-298, jul./dez. 2002.
11. IYOMASA, M.M. Estudo morfológico, **morfométrico e estereológico das alterações presentes na língua de fetos de ratos sob ação do níquel**. 1995. 88 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1995.
12. LATHI, A.; ANTILA, E.; SAXEN, L. The effects 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.37-42, Aug. 1972.
13. LU, C.C. et al. Teratogenic effects of nickel chloride on embryogenic mice and its transfer to embryonic mice. **Teratology**, New York, v.19, n. 2, p.137-142, Apr. 1979.
14. MAS, A.; HOLT, D.; WEBB, M. The acute toxicity and teratogenicity of nickel in the pregnant rat. **Toxicology**, New York, v. 35, n. 1, p.45-47, Apr. 1985.
15. MAS, A. et al. Distribution and kinetics of injected nickel in the pregnant rat. **Clin. Exper. Pharmacol. Physiol.**,

- Oxford, v. 13, n. 2, p.91-96, Feb. 1986.
16. MATHEUS, M.T.G. et al. Efeito da ciclofosfamida sobre o desenvolvimento de germe dental do incisivo do camundongo. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v.19, n. 1, p.41-49, jan./jun. 1990.
 17. MATHEUS, M.T.G. et. al. Efeitos da ação da ciclofosfamida administrada durante a prenhez no desenvolvimento de molares de fetos de camundongos. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v.2, n. 1, p.9-20, jan./jun. 1994.
 18. MORSE, A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bone for sectioning in paraffin. **J. Dent. Res.**, Chicago, v. 24, n. 3/4, p. 143-153, June/Aug. 1945.
 19. PELOZO, A.M.; HETEM, S.; MATHEUS, M.T.G. Efeitos da ivermectina sobre o fechamento do palato e sobre o desenvolvimento do germe dental de camundongos. **Rev. Odontol. UNESP**, São Paulo, v. 23, n. 2, p. 203-211, jul./dez. 1994.
 20. 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, n. 2, p. 203-215, Aug. 1952.
 21. SCHROEDER, H.A.; MICHENER, M. Toxic effects of trace elements on the reproduction of mice and rats. **Arch. Environ. Health**, Chicago, v. 23, n. 2, p.102-106, Aug. 1971.
 22. SERAFIM, D.S.; RAMALHO, L.T.O. Desenvolvimento do germe dental em fetos de camundongos submetidos à ação do cloreto de níquel. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 10., Araraquara, 1998. **Anais...** São Paulo, 1998. p. 272.
 23. SHAH, R.M.; CHAUDHRY, A. P. Hydrocortisone-induced cleft palate in hamsters. **Teratology**, New York, v. 7, n. 2, p.191-194, Apr. 1973.
 24. SHEPARD, T.H. **Catalog of teratogenic agents**. 9th ed. Baltimore: Johns Hopkins, 1998. p. 490.
 25. SMITH, M.K. et.al. Perinatal toxicity associated with nickel chloride exposure. **Environ. Res.**, New York, v. 61, n. 2, p.200-211, May 1993.
 26. STEFFEK, A.J.; VERRUSIO, A.C.; WATKINS, C.A. Cleft palate in rodents after maternal treatments with various lathrogenic agents. **Teratology**, New York, v. 5, n. 1, p. 33-38, Feb. 1972.
 27. STOKENG, R.; JONSEN, J. Nickel toxicity in embryogenesis in mice. **Toxicology**, New York, v. 20, n. 1, p. 45-51, 1981.
 28. SUNDERMAN, F.W. et al. Eye malformation in rats: Induction by prenatal exposure to nickel carbonyl. **Science**, Washington, v. 203, n. 4380, p. 550-553, Feb. 1979.
 29. SUNDERMAN, F.W. et al. Embryotoxicity and fetal toxicity of nickel in rats. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, New York, v. 43, n. 2, p. 381-390, Feb. 1978.
 30. ZIMMERMAN, A.W. Hiperzincemia in anencephaly and spina bifida. A clue to the pathogenesis of neural tube defects? **Neurology**, Minneapolis, v. 34, n. 4, p. 443-450, Apr. 1984.