

## HOMENAGENS PÓSTUMAS

À memória de meu pai

Ao Prof. Dr. PAULO SIMÕES, e  
-chefe e, sobretudo, grande  
migo.

À minha mãe

À minha esposa, Maria Isabel, e  
às minhas filhas: Maria Lúcia e  
Adriana.

ROBERTO JOSÉ GONÇALVES

Cirurgião Dentista

ESTUDO HISTOPATOLÓGICO, COMPARATIVO, DAS REAÇÕES HOSPE-  
DEIRAS PROVOCADAS POR IMPLANTES ÓSSEOS HOMÓGENOS E HETE-  
RÓGENOS CONSERVADOS EM FORMOL A 10%, LAVADOS E NÃO LAVA-  
DOS, EM MANDÍBULAS DE RATOS ALBINOS (*Rattus norvegicus*  
*albinus*).

Tese apresentada à Facul-  
dade de Odontologia de Pira-  
cicaba da Universidade de Cam-  
pinas, para obtenção do grau  
de Doutor em Ciências (Cirur-  
gia Buco-Facial)

PIRACICABA

1968

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

## AGRADECIMENTOS

Ao Exmo. Sr. Prof. Dr. CARLOS HENRIQUE ROBERTSON LIBERALLI, ilustre Diretor da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, nosso reconhecimento pelo incentivo que sempre tem dispensado àqueles que se dedicam ao ensino e à pesquisa.

Ao Prof. Dr. JOSÉ MERZEL, mestre e amigo, pela segura orientação no desenvolvimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. NYLCEO MARQUES DE CASTRO, Chefe do Departamento de Morfologia da Escola Paulista de Medicina, pelas valiosíssimas sugestões em todo o transcorrer dessa pesquisa; nosso profundo agradecimento, - também, pela franquia dos laboratórios de seu Departamento, no qual elaboramos grande parte desse trabalho.

Ao Prof. Dr. MÁRIO ENZO ÁTILA PASCUALUCCI, - Chefe do Departamento de Patologia da E.P.M., pela imprescindível colaboração na interpretação dos resultados histopatológicos.

Ao Prof. Assistente Dr. CÁSSIO ODNEI GARCIA MUNHOZ, da Cadeira de Morfologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas, pelas utilíssimas sugestões apresentadas, bem como pela colaboração valiosa na redação da presente tese.

Aos demais membros da Cadeira de Morfologia - da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas, e, em especial, ao Prof. Assistente Dr. ANTONIO CARLOS FERRAZ CORRÊA, por nos haverem proporcionado um convívio amigo e desinteressado.

Aos colegas da Cadeira de Cirurgia Buco-Fa-

cial, pelo apoio e compreensão durante a elaboração deste trabalho.

Aos Drs. JOSÉ CASSIANO DE FIGUEIREDO E GUILHERME BLUMEN, assistentes do Departamento de Morfologia da E.P.M., nossos agradecimentos pelo auxílio inestimável na elaboração da documentação fotomicrográfica.

À Srta. LUIZA MARIA CEPEDA, Bibliotecária da Biblioteca Regional de Medicina, da Organização Panamericana de Saúde, nosso agradecimento por colaborar na obtenção da bibliografia consultada.

Ao Sr. PAULO DO AMARAL, pela colaboração no desempenho da parte técnica.

Ao Dr. CECÍLIO ELIAS NETTO, ilustre jornalista conterrâneo e amigo, pela correção do vernáculo.

À Srta. LINDA SARKIS pelo trabalho de datilografia; ao Sr. SEBASTIÃO RODRIGUES DE BARROS pela impressão das matrizes.

Agradecemos, também, a todos àqueles que, de uma maneira ou de outra, colaboraram para que este trabalho se tornasse uma realidade.

\*  
\*   \*

## Í N D I C E

	pg.
1 - INTRODUÇÃO .....	8
2 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	20
2.1 - MATERIAIS .....	20
2.1.1 - Implantes homogêneos conservados em formol a 10% .....	20
2.1.2 - Implantes heterogêneos conservados em formol a 10% .....	21
2.1.3 - Animais hospedeiros .....	22
2.2 - MÉTODOS .....	22
2.2.1 - Técnica dos enxertos .....	22
2.2.2 - Técnicas histológicas .....	24
3 - RESULTADOS .....	25
3.1 - Resultados obtidos com o Grupo I .....	25
3.1.1 - Animais sacrificados 24 horas a- pós os enxertos .....	26
3.1.2 - Animais sacrificados 48 horas a- pós os enxertos .....	26
3.1.3 - Animais sacrificados 7 dias após os enxertos .....	27
3.1.4 - Animais sacrificados 14 dias após os enxertos .....	28
3.2 - Resultados obtidos com o Grupo II .....	28
3.2.1 - Animais sacrificados 24 horas a- pós os enxertos .....	29
3.2.2 - Animais sacrificados 48 horas a- pós os enxertos .....	29
3.2.3 - Animais sacrificados 7 dias após os enxertos .....	30
3.2.4 - Animais sacrificados 14 dias após os enxertos .....	31
3.3 - TABELAS .....	33
3.4 - DOCUMENTAÇÃO FOTOMICROGRÁFICA .....	37
4 - DISCUSSÃO .....	46
5 - CONCLUSÕES .....	52
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53

## 1 - INTRODUÇÃO

A substituição de perdas ósseas por enxertos é, indubitavelmente, prática das mais antigas no campo da Medicina. O primeiro caso relatado na literatura, - no qual se obteve sucesso, foi o de Van MEEKEREN (1668), que corrigiu a perda óssea do crânio de um soldado russo através do transplante de osso proveniente da calota craneana do cão. Depreende-se, assim, que o uso de osso de outra espécie animal como enxerto no homem (heterógeno) antecedeu, em muito, o emprêgo de enxertos autógenos e homogênos. Os enxertos autógenos só foram relatados 153 anos mais tarde por Von WALTHER (1821), sendo que os primeiros sucessos com êste tipo de transplante, aplicados internamente, foram descritos por ALBEE (1915), baseado em 400 casos clínicos. Já os enxertos homogênos foram realizados experimentalmente, - pela primeira vez, por OLLIER (1860), que, inclusive, veio demonstrar a importância do periósteeo na sobrevivência do transplante. Os primeiros resultados clínicos obtidos com os homotransplantes foram os de MACEWEN (1878) apud HINDS (1962), substituindo, com êxito, uma grande parte do úmero de uma criança acometida de osteomielite.

Posteriormente, muitas investigações foram realizadas com o objetivo de se verificar o comportamento dos enxertos ósseos e relacioná-lo com as reações hospedeiras. Com essa finalidade, os enxertos homogênos e heterógenos foram empregados nas mais variadas condições e submetidos aos mais diversos tratamentos e, quase sempre, a fim de se estabelecer comparações com os enxertos autógenos.

Coube a GALLIE (1918), o emprêgo, pela primeira vez, de enxertos ósseos heterógenos submetidos a tratamento prévio à sua implantação. Utilizando-os fervidos, obteve resultados que lhe permitiram a afirmação de que "as trocas que ocorriam em tôrno dos enxertos eram as mesmas, quer se tratassem de autógenos e heterógenos frescos ou similares, porém, fervidos". BEUBE & SILVERS (1936), empregando osso fervido porém pulverizado, em procedimentos cirúrgicos orais, confirmaram as observações de GALLIE (1918). Já LLOYD-ROBERTS (1952) utilizou enxertos homogêneos humanos fervidos mas obtidos por necrópsia, descrevendo quatro casos clínicos de sucesso; concluiu que o tempo de incorporação desses enxertos era um pouco maior que o dos autógenos, no que foi corroborado por BLAIMONT (1960), que efetuou a análise experimental de osso cortical homogêneo e heterogêneo, obtidos e tratados pelo mesmo processo.

O primeiro autor a se preocupar com o problema da conservação do osso para posterior utilização, foi ORELL (1934), que removeu a parte orgânica do osso por processos químicos, afim de torná-lo mais "aceitável" ao receptor; apesar dessa melhor aceitabilidade-hospedeira, houve um atraso considerável no tempo de incorporação do mesmo, fato que levou o mesmo ORELL (1937) a implantá-lo sub-periosticamente sobre a tíbia de um doador, removendo-o após um ou dois meses; notou, então, a formação de um osso vascular, ao qual denominou "os novum". Comparando-o, experimentalmente, com o "os purum" e o osso fervido, concluiu que, entre os três, era o que melhor se incorporava. CASANUEVA DEL C. & VELASCO S. (1942), introduzindo algumas inovações técnicas, prepararam o "os purum", obtendo sucessos em diversos enxertos, terminando por concluir que o mesmo tinha

"o significado de uma prótese interna rígida e reabsorvível, biològicamente muito superior à prótese metálica".

A congelação é, provàvelmente, um dos melhores métodos de conservação de osso em banco, pois priva-o de sua antigenicidade sem, contudo, modificar suas estruturas fundamentais. INCLAN (1942) foi, possivelmente, o primeiro a mencionar êste método, apresentando 52 casos clínicos de enxertos homogênos e heterôgenos, com bons resultados; seguiram-lhe WILSON (1947) e BUSH & GARBAR (1948), cujos trabalhos deram bases definitivas aos métodos de congelação e refrigeração à baixa temperatura, além do mérito de concentrar as atenções para a ausência de antigenicidade desses tipos de enxertos. Deram, outrossim, início aos bancos ósseos humanos nos Estados Unidos. JUDET & ARVISET (1949), baseados no trabalho de WILSON (1947), organizaram o primeiro banco ósseo na França; diante da dificuldade na obtenção de osso humano, orientaram-se, deliberadamente, para o osso de vitelo. Relataram 40 sucessos clínicos, concluindo que "a congelação do heterotransplante torna-o viável, pois o frio intenso, - provàvelmente, causa-lhe modificações profundas, que o priva de sua especificidade". No Brasil, CARVALHO e col. (1952) e na França, JUDET e col. (1952), relataram bons resultados clínicos com enxertos homogênos congelados, concluindo êstes últimos que "de tôdas as variedades de enxertos mortos empregados até a atualidade, o congelado nos parece o mais utilizável". Já RAY e col. (1952), provando experimentalmente o osso congelado e o liofilizado, demonstraram a ineficácia de ambos, acabando por preconizarem o osso embrionário congelado. STAGNARA & DUBOST-PERRET (1950), GUILLEMINET e col. (1953) e KLEINBERG (1954), publicaram, com suces-

so, suas experiências de enxertos de vitelo congelados, concluindo, porém, o último autor, que existe diferença, para mais, no tempo de incorporação dos mesmos, - quando comparados aos autógenos. SICARD & MOULY (1954) reportaram bons resultados clínicos, com apenas 21,5% - de fracassos, com homoenxertos congelados obtidos de ca dá ver. Na cavidade oral, também foram obtidos êxitos com os enxertos congelados, como reportaram HUEBSCH (1954) e FREIDEL (1957). TURNER e col. (1955), entretanto, introduziram os enxertos sêco-congelados ("freeze-dried") e conservados no vácuo, concluindo pela sua superioridade sôbre os congelados totais, quer sejam homo ou heterógenos. Finalmente, VALENTIN & LARCHER (1959) u ti liz ar am, experimentalmente, osso liofilizado e conserv a d o em refrigerador comum, obtendo bons resultados, no que foram corroborados por BOUTET (1959), que preconizou, sobretudo, o osso de vitelo liofilizado, com o - qual obteve resultados bem próximos dos autógenos; opinião idêntica foi emitida por VALENTIN & LAPRAS (1959), a respeito dos enxertos heterógenos liofilizados.

Movido por evidências clínicas e experimentais de que tecidos fetais ou de recém-nascidos possuam reduzida antigenicidade, TUCKER (1953, 1956) realizou estudos clínicos com enxertos ósseos de feto bovino (vitelo), obtendo diversos casos com êxito; utilizou -os, inicialmente, em fragmentos conservados em plasma homogêneo a 20% e, posteriormente, em pasta óssea, mais tarde denominada "osteogen". GEORGIADÉ e col. (1959), u ti liz an d o o "osteogen" em cirurgia reconstrutiva da face, obtiveram, igualmente, bons resultados. ANDERSON e col. (1959) demonstraram que, quando em forma de pasta óssea, êsses enxertos se revascularizam quase tão rapidamente quanto os autógenos frescos. Tal afirmativa -

foi confirmada por GRESHAM & THOMAS (1962) ao realizarem estudo experimental, comparativo, desses enxertos com os autógenos frescos e homogêneos seco-congelados. NEVINS e col. (1961) também encontraram resultados relativamente bons, ao preencherem alvéolos desdentados de cães com "osteogen". Por outro lado, SHANKWALKER & MITCHELL (1958), utilizando-o experimentalmente, concluíram que não houve regeneração óssea apreciável junto ao mesmo, fato confirmado por GILBERTSON & CLARK JR. (1959), que o utilizaram em alvéolos edêntulos de ratos, acabando por concluir que a neo-formação óssea era retardada com reações inflamatórias de corpo estranho nas fases precoces de sua incorporação. Já KENNEDY & WELLINGTON (1963) concluíram, enfaticamente, que este material não estimulava osteogênese e era rejeitado pelo hospedeiro em vários graus de resposta inflamatória.

O "merthiolate" foi, sem dúvida, o primeiro agente químico empregado para a conservação de tecido ósseo em banco. REYNOLDS e col. (1953), utilizando osso conservado por este método como material de implante, concluíram que os mesmos podem ser incorporados pelo hospedeiro, embora muito lentamente. KRØMER (1963), utilizando-o clinicamente na cavidade oral, demonstrou que esse tipo de implante é bem aceito para o preenchimento de defeitos ósseos provenientes de enucleações de cistos ou de bolsas periodontais.

SABANAS e col. (1955 a) introduziram o uso de implantes ósseos homogêneos conservados em acetona e compararam-nos com os totais congelados. Concluíram que esses implantes são incorporados da mesma maneira que os congelados, sem reações a corpo estranho e com a vantagem de serem conservados por um método simples e econômico. Posteriormente, SABANAS e col. (1955 b),

observando que bactérias esporuladas sobreviviam às longas exposições do osso em acetona, trataram-no com solução de formaldeído a 1%, por 6 horas, lavando-o e secando-o em seguida. Esse osso foi, então, utilizado como material de implante e comparado com os conservados em acetona somente. Concluíram que os implantes conservados em acetona e formol mostraram maior formação de tecido osteóide, bem como mais rápida revascularização e preenchimento dos defeitos ósseos. Contraditòriamente, GAFFNEY e col. (1958), utilizando-os experimentalmente, demonstraram que não são bem reabsorvidos pelo organismo receptor, bem como não apresentaram resultados que os recomendem em procedimentos clínico-cirúrgicos.

Cientes de que a parte orgânica dos transplantes heterógenos frescos era a responsável pelos fenômenos de rejeição inflamatória, LOSEE & HURLEY (1956) idealizaram um método para sua remoção em aparelho extrator próprio, utilizando um solvente orgânico, a etilenodiamina (ED); obtiveram, assim, um material poroso e branquíssimo, que denominaram "osso anorgânico". Usando tecido ósseo proveniente de diversas fontes doadoras e tratados por este processo, compararam-nos com transplantes autógenos frescos e implantes conservados em álcool, mertiolato e congelação. Concluíram que o "osso anorgânico" era bem aceito pelo hospedeiro, remodelando-se, de maneira similar, ao autógeno fresco e, aparentemente, com maior rapidez. BOYNE & LOSEE (1957 a, 1957 b, 1958), usando-o, tanto experimental como clinicamente, demonstraram que é biologicamente bem aceito pelo hospedeiro, com aparecimento de osso reativo, por aposição, ao final de 7 semanas. LYON & LOSEE (1958), BOYNE e col. (1958) e BOYNE (1958), utilizando "osso anorgânico" em animais e no homem, para preenchimento de defeitos ósseos orais provenientes de lesões periapicais ou perio-

dontais e extrações dentais, demonstraram ausência de reações a corpo estranho, com manutenção da altura e contôrno dos rebordos alveolares, principalmente quando implantados em zonas ricamente vascularizadas, como demonstrou LYON (1959). HAYWARD e col. (1958) demonstraram diversos sucessos clínicos com o "osso anorgânico", aduzindo, entretanto, que os autógenos frescos exibiam melhores resultados, embora fôsem mais friáveis. HANCOX e col. (1961), comparando o "osso anorgânico" com implantes desproteinizados pela água oxigenada, concluíram pela superioridade dos "anorgânicos", - tanto pela melhor aceitação biológica como pela maior deposição óssea trabecular, nos mesmos. BELL e col. (1958), realizando, em alvéolos humanos, estudos comparativos entre osso total bovino em fragmentos e "osso-anorgânico", concluíram que, embora ambos apresentas - sem resposta inflamatória hospedeira, muitos fragmentos de "osso anorgânico" exibiram neo-aposição óssea, - indicando que os mesmos foram melhor aceitos que os de osso bovino cultivado. Idêntica opinião foi emitida - por BURKE & CLARK Jr. (1959), que aduziram, no entanto, que a altura do rebôrdo alveolar foi aumentada em apenas 1 dos 8 implantes de "osso anorgânico" heteróge no bovino realizados. Em contraposição às opiniões referidas, BOYNE & LYON (1959), MELCHER (1962), KRAMER & WRIGHT (1963) e KRAMER e col. (1964), usando "osso anorgânico", clínica e experimentalmente, em defeitos - da cavidade oral, concluíram que a atividade osteoclás tica e osteoblástica em tôrno de seus fragmentos foram mínimas, levando-os a indicar limitações no uso clínico dêste material; KRAMER & WRIGHT (1963) e KRAMER e col. (1964) acrescentaram, ainda, que o "osso anorgânico" se comportava como um corpo estranho inerte. Final

mente, BELL (1959, 1961), comparando-o com a pasta óssea de vitelo, quando inserido em alvéolos humanos, - demonstrou que nenhum dos dois materiais estimulava - osteogênese hospedeira, retardando, outrossim, a cicatrização dêsses alvéolos.

Outros tipos de implantes heterógenos "anorgânicos" têm sido referidos na literatura, embora esparsamente e sem grande insistência. Dentre êles, destacam-se o "Ossar" (produzido pela Armour Pharm. Co., Chicago) e o "osso de Kiel", obtido de vitelo e macerado em água oxigenada. O "Ossar", referido por VIKARI & AHO (1963) como capaz de estimular osteogênese hospedeira, foi, no entanto, combatido por WESTERHOLM (1963), que concluiu o mesmo agir como um corpo estranho inerte, não aceito incondicionalmente pelo organismo receptor. O "osso de Kiel", preconizado clinicamente por HALLÉN (1966), não teve maior repercussão.

A exemplo dos enxertos "anorgânicos", também os "orgânicos", isto é, obtidos pela descalcificação da matriz óssea em EDTA, foram utilizados como materiais de implante. Assim, MURRAY e col. (1960), realizando estudos comparativos entre enxertos "anorgânicos" e "orgânicos", concluíram que as reações inflamatórias hospedeiras eram mais acentuadas nos enxertos-"anorgânicos", enquanto que os "orgânicos" eram melhor incorporados. STICKEL (1961), analisando o enxerto "orgânico", experimentalmente, demonstrou que o mesmo foi gradativamente reabsorvido e substituído por novo osso, embora, em alguns cortes histológicos, fôsse notada a formação de tecido fibroso entre o enxerto e o hospedeiro. Interessante análise experimental foi encetada por FREIBERG & RAY (1964), comparan-

do o comportamento de quatro tipos de enxertos, todos desvitalizados: autógeno e homogêneo desvitalizados por congelação e conservados em acetona e homogêneos "orgânicos" e "anorgânicos". Concluíram que o homogêneo "orgânico" incorporou-se completamente ao hospedeiro, embora um pouco mais lentamente que o autógeno, enquanto que o homogêneo desvitalizado o fez bem tardiamente em relação a ambos, exibindo reação de células gigantes; já o "anorgânico" apresentou reações inflamatórias intensas, com mínima neo-formação óssea. Já MELCHER & IRVING (1963), estudando a média de cicatrização de enxertos "orgânicos", "anorgânicos" e autógenos ( cortical e esponjoso ), mostraram que nenhum dos dois implantes desvitalizados foi capaz de induzir neo-formação óssea aceitável.

Mais recentemente, outro processo para se remover a matriz orgânica, o grande componente antigênico do osso total, foi descrito. Com efeito, MILLO-  
NING (1962) apud CARVALHO & COURA (1965), descreveu uma técnica que consistia em submeter o tecido ósseo de vitelo a um detergente biológico, um solvente orgânico e lavagem em água esterilizada. A seguir, esse material era liofilizado e conservado a vácuo, em frascos apropriados, sendo conhecido, comercialmente, como "Bo-  
plant". KARGES e col. (1963) e ANDERSON e col. (1963) apresentaram análises experimentais e clínicas desse material, concluindo que o mesmo é ótimamente aceito - pelo hospedeiro, com resultados semelhantes aos dos autógenos frescos. No Brasil, CARVALHO & COURA (1965), apresentando 54 casos clínicos, obtiveram 94,5% de sucessos com o "Boplant", admitindo, outrossim, que o mesmo substituíria o autógeno com vantagens, pois era vascularizado e incorporado mais rapidamente que este.

Finalmente, SCOPP e col. (1966), estudando a potência de osteogênese do "Boplant", quando comparado com contrôles autógenos, concluíram que o mesmo estimulava - as células osteogênicas do hospedeiro a produzirem nôvo osso, por aposição.

Pela análise da literatura, deduzimos que o enxerto autógeno é o transplante por excelência, - quer pela melhor incorporação hospedeira com ausência de fenômenos de rejeição, quer pela rápida revascularização dos mesmos, com persistência da vitalidade de suas células.

Os obtidos pelos diversos processos de maceração, embora fôsem imunològicamente inertes, além de assépticos, eram lentamente reabsorvidos, sendo - pouco ativos na indução osteogênica. Entre os enxertos macerados, podem-se enquadrar: os obtidos por ebulição, o "os purum", o "os novum", o "osso anorgânico" obtido pela ED, o "osso de Kiel" e o "Ossar". O "osso anorgânico" e o "osso de Kiel" foram considerados, ainda, corpos estranhos inertes. O "Boplant", embora se enquadra entre os macerados, não foi, ainda, suficientemente estudado para admitir conclusões a seu respeito. É considerado, pelos seus preconizadores, como melhor incorporado que os autógenos frescos.

Dentre os métodos físicos para a conservação de enxertos ósseos em banco, salientaram-se a congelação e a liofilização. Os enxertos congelados, apesar de imunològicamente inertes, estéreis e razoavelmente ativos quanto à indução osteogênica, eram reabsorvidos e incorporados muito lentamente, quando comparados aos autógenos frescos. Os enxertos liofilizados, considerados ligeiramente superiores aos congelados, exigiam, todavia, aparelhagem ultra-especializa-

da na sua obtenção.

Os enxertos de tecido ósseo de origem fetal, tanto em fragmentos como em pasta óssea, tiveram resultados controversos. Defendidos por alguns autores, que afirmaram que os mesmos se revascularizavam e se incorporavam quase tão rapidamente quanto os autógenos frescos, foram, entretanto, combatidos por outros, que concluíram que os mesmos não estimulavam osteogênese, além de serem rejeitados pelo organismo hospedeiro.

Similarmente, o "osso orgânico", ou seja, descalcificado pelo EDTA, embora contasse com alguns adeptos que demonstraram êxitos em sua incorporação ao hospedeiro, comparável, inclusive, à dos autógenos, foram considerados, por outros, como incapazes de induzirem osteogênese hospedeira.

Foram inúmeros os métodos químicos preconizados para a conservação de tecido ósseo, para, posteriormente, utilizá-lo como implantes. Dentre eles, destacaram-se, todavia, os que empregavam o "merthiolate", a acetona e a acetona associada ao formol; os materiais de implantes assim obtidos apresentavam as vantagens de serem estéreis e conservados por técnica simples e econômica. Seus preconizadores consideraram-nos bem aceitos pelo hospedeiro, sem reações a corpo estranho, além de serem revascularizados e incorporados, com relativa rapidez. Contraditoriamente, outros autores os consideraram como incorporados e reabsorvidos com grande lentidão, fato que os contraindicavam para utilização clínica.

Por sugestão do Prof. José Merzel, empregamos, experimentalmente, implantes homogêneos e heterogêneos de osso total conservado em formol a 10%, lavados e não lavados antes de sua inserção no organismo hospe-

deiro. Verificamos, outrossim, pela literatura consultada, que tal método de conservação óssea em banco não havia sido utilizado senão quando associado à acetona (SABANAS e col. - 1955 b).

Dois motivos principais nos levaram à presente pesquisa: as inúmeras controvérsias surgidas na utilização de implantes conservados ou obtidos por diferentes métodos e, em especial, nos conservados quimicamente, salientando-se entre êsses, o conservado em acetona e formol; o fato de outros tecidos (aponevrose, tendão, músculo e enxerto aórtico), conservados em formol, terem sido utilizados, com sucesso, como enxertos, clínica e experimentalmente (REGOLI - 1922, NU-BOER - 1954).

A análise experimental de implantes homogêneos e heterógenos conservados em formol a 10%, lavados e não lavados antes dos enxertos, foi encetada com os seguintes objetivos primordiais:

1. Demonstrar, histopatologicamente, as reações hospedeiras precoces, frente a êsses materiais de implante.

2. Determinar, comparativamente, as possíveis divergências no comportamento dos implantes lavados e dos não lavados.

3. Analisar, por comparação, a pretensa inespecificidade dos enxertos ósseos conservados, isto é, reações hospedeiras idênticas, quer se tratem de homo ou heteroimplantes.

4. Verificar, baseados na presente investigação, a viabilidade dos tecidos ósseos conservados em formol a 10%, como material de implante.

## 2 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 - MATERIAIS

#### 2.1.1 - Implantes homogêneos conservados em formol a 10% \*\*

Um rato albino adulto jovem (*Rattus norvegicus-albinus*, Wistar), macho, pesando 224 gramas, foi sacrificado, sob anestesia, pela inalação de éter. Os membros inferiores, após depilação, foram excisados e, em seguida, separou-se totalmente o tecido muscular - do osso. Com uma rugina, removeram-se, totalmente, os periósteos dos fêmures, tíbias e fíbulas do animal, após o que se procedeu à desarticulação dos mesmos. Esses ossos foram colocados em soro fisiológico e, em seguida, removeram-se suas epífises com um osteótomo. As diáfises foram, então, fragmentadas em pequenos estiletos de formas irregulares e tamanhos aproximadamente iguais. Tais estiletos foram colocados em uma solução de formol a 10%. Parte desses estiletos foi conservada em formol, renovado a cada 7 dias, até a ocasião dos enxertos, constituindo-se nos implantes homogêneos conservados em formol e não lavados.

Na medida das necessidades, 24 horas antes dos

---

\*\* = O termo implante será, doravante, empregado para designar os enxertos conservados em formol. Tal nomenclatura foi proposta por URIST (1960), para definir os enxertos desvitalizados, entre os quais se enquadra o conservado quimicamente. Esta designação foi aceita, entre outros, por BURWELL (1964), BASSETT & RUEDILINDECKER (1964) e BARROS (1966). Reservamos o termo enxerto para definir o ato de se inserir o implante no local hospedeiro.

enxertos, retiraram-se alguns estiletos do fixador, transportando-os para um frasco contendo água destilada esterilizada (autoclavada à 120°C, 1 atmosfera, por 15 minutos). Esta operação efetuou-se com uma pinça clínica flambada. Durante as 24 horas que antecederam aos enxertos, fizeram-se quatro trocas de água destilada esterilizada, uma a cada 6 horas. Essas lavagens foram realizadas para remover o formol em excesso do material de implante. Os estiletos, - assim obtidos, constituíram-se nos implantes homogênos conservados em formol e lavados.

#### 2.1.2 - Implantes heterógenos conservados em formol a 10%

Um cão, sem raça definida, adulto jovem, macho, pesando 5 quilos e 300 gramas, foi sacrificado sob anestesia endovenosa de Pentobarbital sódico (Nembutal "Abbott"). As coxas dos membros inferiores, após serem depiladas, foram excisadas na porção correspondente à parte média das diáfises femurais. O tecido muscular foi totalmente desinserido e o perióstio, destacado da superfície óssea com uma rugina. Com uma serra de Gigli, retirou-se um fragmento de, aproximadamente, dois centímetros da parte média diafisária dos fêmures do animal. Os fragmentos, após passagem por uma solução de soro fisiológico, foram reduzidos a estiletos e conservados em solução de formol a 10%. Tais estiletos, à semelhança do material homogêno, foram conservados em formol até a ocasião dos enxertos ou lavados por 24 horas antes dos mesmos, constituindo-se, respectivamente, nos implantes heterógenos conservados em formol e não lavados e implantes heterógenos conserva-

dos em formol e lavados.

### 2.1.3 - Animais hospedeiros

Ratos brancos, adultos, jovens (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), machos, pesando de 200 a 250 gramas (pêso verificado em balanças apropriadas) e mantidos, antes e durante o período experimental, sob alimentação balanceada e água "ad libitum", foram os animais hospedeiros do presente estudo. Êsses animais foram divididos ao acaso em 2 grupos: GRUPO I, constituído de 8 animais, que receberam implantes homógenos e heterógenos conservados em formol e não lavados e GRUPO II, também constituído de 8 animais, que receberam implantes homógenos e heterógenos conservados em formol e lavados.

## 2.2 - MÉTODOS

### 2.2.1 - Técnica dos enxertos

Os animais, em jejum, receberam, inicialmente, como anestesia de base, injeção intraperitoneal de Pentobarbital sódico (Nembutal "Abbott") na dosagem de 40 mg. por quilo de pêso, gradativamente completa da pela inalação de éter. Procedeu-se, então, à depilação da zona correspondente à hemimandíbula esquerda dos animais, seguida por antissepsia da pele com tintura de "merthiolate". Efetuou-se, então, uma incisão horizontal e paralela à base da mandíbula, - mais ou menos à altura da parte média da mesma, que se estendeu do ângulo goníaco à região de incisivos. Essa incisão, inicialmente, interessou apenas à pele e tecido celular sub-cutâneo. Expôs-se, por dissecação, a camada muscular que envolvia a porção lateral da mandíbula, a qual foi incisada profundamente até

tecido ósseo. Procedeu-se, a seguir, à separação dessa camada muscular até que toda a hemimandíbula fôsse exposta. Com um instrumento p rfuro-contundente, especialmente adaptado para tal fim e aplicado perpendicularmente à superfície óssea, produziram-se dois orifícios, separados, entre si, cêrca de 5 milímetros. Tais orifícios obedeceram à localiza es pré-determinadas, de modo que um deles foi praticado em local próximo à linha mediana da mandíbula, enquanto que o outro foi realizado em local distante da mesma linha. Êsses orifícios foram produzidos com profundidade tal, que atravessaram as corticais externa e interna do osso mandibular, sem, contudo, lesar as partes moles adjacentes-à face interna do mesmo. Os estiletos ósseos foram, então, implantados, sob pressão, nesses orifícios. Tanto nos animais componentes do Grupo I, como nos animais que compunham o Grupo II, os orifícios próximos à linha mediana receberam estiletos ósseos heterógenos, ao passo que os orifícios distantes desta linha receberam estiletos ósseos homógenos. O tecido muscular e periósteo afastados foram reconduzidos a seus lugares primitivos e suturados com fio de algodão n  16. Procedeu-se, finalmente, à sutura do plano cutâneo com o mesmo material, encerrando-se a opera o com a aplica o de tintura de iodo sôbre a ferida cirúrgica. Os animais foram colocados em gaiolas individuais e 40 g tas de "novalgina" foram adicionadas à água de que os animais se serviriam. Nenhuma medica o antibiótica foi utilizada. O instrumental e material cirúrgico usados foram préviamente autoclavados e todos os rigores de assepsia possíveis foram observados durante a interven o.

### 2.2.2 - Técnicas histológicas

Os ratos, que compunham os Grupos I e II, foram sacrificados, aos pares, 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias após os enxertos. Esses animais foram previamente submetidos à inalação de éter, e, por dissecação, a hemimandíbula esquerda foi desarticulada e removida, inclusive, com seu envoltório muscular. Após rápida passagem por sôro fisiológico, as hemimandíbulas foram colocadas em Bouin e fixadas por 24 horas. Após a fixação, as peças foram descalcificadas em ácido tricloroacético a 5%, à temperatura ambiente, por 5 dias em média, aparadas e incluídas em celoidina-parafina, segundo o método de PÉTERFI, modificado por ROMEIS (1928). Foram, então, realizados cortes semi-seriados de 8 micra e corados rotineiramente pela Hematoxilina-eosina e Tricrômico de Mallory.

\*

\* \*

### 3 - RESULTADOS

Com o intuito de tornar a análise dos resultados mais objetiva, elaboraram-se tabelas (vide parágrafo 3.3 ), nas quais se procurou exprimir de maneira sintética, embora subjetivamente, as diferenças - quantitativas entre as estruturas observadas nas reações hospedeiras frente aos diferentes tipos de implantes conservados em formol. Com efeito, na tabela 1, são cotejados os resultados obtidos com os implantes homogêneos e heterógenos não lavados, ao passo que, na tabela 2, fêz-se o mesmo com os implantes homogêneos e heterógenos lavados. Já na tabela 3, agruparam-se os dados extraídos das tabelas 1 e 2, de maneira a permitir, por comparação, ressaltar as possíveis diferenças nas reações hospedeiras frente aos implantes não lavados e lavados.

As pranchas 1, 2, 3 e 4 documentam os resultados obtidos com os diversos implantes conservados em formol a 10%. Procurou-se exibir, nas fotomicrografias, campos microscópicos que mostrassem as reações hospedeiras típicas ou predominantes, a cada tipo de implante e nos diferentes tempos pós-operatórios.

Pela análise dos cortes microscópicos obtidos dos animais dos Grupos I e II, chegou-se aos seguintes resultados:

#### 3.1 - Resultados obtidos com o Grupo I

Nesse grupo, enquadram-se ratos que receberam implantes homogêneos e heterógenos conservados em formol a 10% e não lavados. Em tais animais, sacrificados aos pares, 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias a pós os enxertos observaram-se os seguintes resultados

histopatológicos:

3.1.1 - Animais sacrificados 24 horas após os enxertos:

Implantes homogêneos: - Os implantes ósseos - acham-se um pouco afastados do tecido hospedeiro, provavelmente devido à formação de edema pós-operatório. Para o lado do receptor, notou-se um moderado infiltrado inflamatório agudo, circundando os implantes. - Esse quadro inflamatório foi envolvido por moderado exsudato reticular de fibrina. Notou-se, também, a presença de inúmeras espículas ósseas, resultantes da perfuração óssea praticada. Houve ausência de atividade osteoclástica e osteogênica hospedeira. Nos limites externos do processo inflamatório agudo, notou-se a presença de alguns linfócitos e plasmócitos, sugerindo início de cronicidade do mesmo (Tabela 1, figs. 1 e 2).

Implantes heterogêneos: - O quadro histopatológico é bem semelhante ao anterior. A inflamação aguda, entretanto, é mais acentuada do que aquela observada nos hospedeiros que receberam implantes homogêneos; - houve ausência de células linfocitárias e plasmocitárias (Tabela 1, figs. 3 e 4).

3.1.2 - Animais sacrificados 48 horas após os enxertos:

Implantes homogêneos: - Implantes ósseos ainda afastados do receptor. Presença excessiva de exsudato de fibrina. Houve condensação abundante de neutrófilos em torno dos implantes com a formação de microabscessos agudos. Ausência de reabsorção e de neo-formação óssea nos implantes (Tabela 1, figs. 5 e 6).

Implantes heterógenos:- O quadro histopatológico difere do anterior em 2 pontos: 1. exibe menor quantidade de exsudato reticular de fibrina e 2. apresenta grande quantidade de neutrófilos que, entretanto, não se condensam, formando microabcessos.

### 3.1.3 - Animais sacrificados 7 dias após os enxertos:

Implantes homogênos:- Houve ausência de fenômenos de reabsorção e de osteogênese na superfície dos implantes. Em tórno dos mesmos, ainda existe pequena quantidade de exsudato de fibrina e neutrófilos. Externamente, porém, êste quadro inflamatório assume características crônicas, pela presença de linfócitos e plasmócitos. Delimitando-se êsse processo, notou-se a presença de reações proliferativas, que consistiam de grande quantidade de tecido de granulação ricamente vascularizado, fibroblastos e moderada quantidade de fibras colágenas. Essas fibras, facilmente distinguíveis pela coloração tricrômica, dispunham-se de maneira desordenada em tórno do tecido de granulação jovem. Notou-se, ao nível dêsse tecido, a presença de alguns macrófagos e pequena quantidade de osteoclastos reabsorvendo partículas ósseas esparsas. Pareceu-nos que, por intermédio das reações inflamatórias e proliferativas descritas, o hospedeiro tenta isolar-se dos implantes ósseos (Tabela 1, figs. 9 e 10).

Implantes heterógenos:- As reações hospedeiras assemelham-se às descritas para os homogênos, embora as proliferativas sejam menos acentuadas e as inflamatórias ligeiramente mais intensas (Tabela 1, figs. 11 e 12).

#### 3.1.4 - Animais sacrificados 14 dias após os enxertos:

Implantes homogêneos:- Não houve reabsorção e neo-aposição óssea nos implantes. Em todos os cortes examinados, distinguiram-se três camadas distintas ao redor dos implantes. A primeira, intimamente relacionada com os mesmos, era constituída de quantidade mínima de exsudato fibrinoso e neutrófilos. A segunda, envolvendo concêntricamente a anterior, constituía-se de quantidade moderada de tecido de granulação jovem e células características de processo inflamatório-crônico (linfócitos e plasmócitos). A terceira camada exibia grande quantidade de fibroblastos e de fibras colágenas (Tabela 1). Essas fibras, quando limitam o tecido de granulação, orientam-se desordenadamente. Externamente, porém, êsse tecido fibroso se distribui em lâminas concêntricas de fibras colágenas, que englobam, inteiramente, os implantes e as reações descritas. Trata-se, indubitavelmente, de uma reação a corpo estranho do tipo encapsulante, assemelhando-se a um granuloma fibroso. Não se notou a presença de células gigantes de corpo estranho, embora houvesse quantidade moderada de osteoclastos, reabsorvendo partículas ósseas esparsas (figs. 13 e 14).

Implantes heterogêneos:- O aparecimento das reações proliferativas, a êste tempo pós-operatório, foi, sensivelmente, retardado em relação ao homogêneo; ao contrário, as reações inflamatórias agudas (neutrófilos) foram mais acentuadas (Tabela 1, figs. 15 e 16).

#### 3.2 - Resultados obtidos com o Grupo II

Nesse grupo, enquadraram-se ratos que receberam

implantes homogêneos e heterogêneos conservados em formol a 10% e lavados. Em tais animais, sacrificados aos pares, 24 horas, 48 horas, 7 dias e 14 dias após o enxerto, observaram-se os seguintes resultados histopatológicos:

3.2.1 - Animais sacrificados 24 horas após os enxertos:

Implantes homogêneos:- O quadro histopatológico, nesses implantes, foi semelhante ao encontrado nos implantes homogêneos do Grupo I (Tabela 2, figs. 17 e 18). Não houve diferenças palpáveis entre as reações hospedeiras aos implantes lavados e não lavados, a este tempo pós-operatório (Tabela 3).

Implantes heterogêneos:- Os resultados, nesse tipo de implantes, são semelhantes, também, aos encontrados nos homônimos não lavados (Tabela 3). Comparados, entretanto, com os homogêneos, também lavados, os implantes heterogêneos exibiram maior número de polimorfonucleares (Tabela 2, figs. 19 e 20).

3.2.2 - Animais sacrificados 48 horas após os enxertos:

Implantes homogêneos:- A esse tempo pós-operatório, notou-se a maior diferença de reação hospedeira entre os implantes homogêneos não lavados e lavados. Enquanto que os não lavados mostraram quantidade excessiva de fibrina e de neutrófilos, os lavados exibiram pequena quantidade de fibrina e polimorfonucleares (Tabela 3). As reações hospedeiras para com os implantes homogêneos lavados são, portanto, mais limitadas (Tabela 2, figs. 21 e 22).

Implantes heterogêneos:- Quando comparados aos

heterógenos do Grupo I, êsses implantes demonstraram respostas inflamatórias agudas menos acentuadas (Tabela 3). No entanto, quando confrontados com os implantes homogêneos do mesmo grupo, verificou-se que os mesmos exibiam maior quantidade de fibrina e leucócitos neutrófilos (Tabela 2, figs. 23 e 24).

### 3.2.3 - Animais sacrificados 7 dias após os enxertos:

Implantes homogêneos:- As reações hospedeiras frente a êsses implantes diferiram das reações aos homogêneos do Grupo I, nos seguintes aspectos: 1. houve ausência de exsudato fibrinoso, com mínima quantidade de neutrófilos. 2. houve decréscimo na quantidade de tecido de granulação; ao contrário, houve considerável aumento de fibroblastos e fibras colágenas (Tabelas 2 e 3, figs. 25 e 26).

Implantes heterógenos:- Nesses implantes, houve reação inflamatória hospedeira, com presença de pequena quantidade de neutrófilos e de exsudato fibrinoso; êsse fato não foi observado para o lado do receptor nos implantes homogêneos, também lavados. As estruturas presentes no hospedeiro, como decorrência da proliferação celular, não foram, nitidamente, diferentes entre os dois tipos de implantes, embora houvesse um ligeiro predomínio de tecido de granulação jovem nos heterógenos e de fibroblastos e fibras colágenas nos implantes homogêneos (Tabela 2, fig. 27). O confronto entre as reações hospedeiras dos implantes heterógenos dos Grupos I e II demonstrou que os lavados exibiram menor grau de resposta inflamatória aguda; as reações proliferativas, ao contrário, foram bem mais acentuadas. Houve um ligeiro aumento

no número de osteoclastos (Tabela 3).

3.2.4 - Animais sacrificados 14 dias após os enxertos:

Implantes homogêneos:- Ausência de reabsorção e de neo-formação óssea, bem como de células do tipo inflamatório agudo (neutrófilos) e exsudato fibrinoso. Notou-se, apenas, infiltrado linfoplasmocitário associado à pequena quantidade de tecido de granulação jovem. Houve presença de grande número de fibroblastos e excessiva quantidade de fibras colágenas, que se dispunham, concêntricamente, em torno dos implantes, encapsulando-os. Trata-se, sem dúvida, de uma reação a corpo estranho, sem, contudo, haver a expulsão dos implantes. Pareceu-nos que os implantes homogêneos lavados são, relativamente, bem tolerados pelo organismo receptor, comportando-se como um corpo estranho inerte (Tabela 2, figs. 29 e 30). Confrontados com os não lavados, verificou-se que os lavados são melhor aceitos pelo hospedeiro por não provocarem reações inflamatórias agudas e, sim, reações proliferativas abundantes (Tabela 3).

Implantes heterogêneos:- Quadro histopatológico semelhante ao anterior. A quantidade de osteoclastos no tecido hospedeiro era, todavia, sensivelmente maior, mas as reações proliferativas (fibroblastos e fibras colágenas) eram menores (Tabela 2, figs. 31 e 32). Comparando-os aos heterogêneos do Grupo I, verificamos, nos lavados, um decréscimo no número de neutrófilos, com aumento de fibroblastos e fibras colágenas. Houve, outrossim, ligeira supremacia no número de osteoclastos (Tabela 5).

Em todos os implantes, dos dois grupos analisa

dos, as estruturas histológicas dos mesmos permaneceram inalteradas até os 14 dias que duraram as experiências. Tal fato foi comprovado pela ausência, nesses implantes, de caracteres tintoriais menos visíveis.

\*

\*           \*

3.3 - TABELAS

TABELA I - Análise quantitativa das estruturas observadas nas reações hospedeiras nos ratos do GRUPO I, que receberam implantes homogêneos e heterogêneos conservados em formol a 10% e não lavados, em diferentes tempos pós-operatórios.

TIPOS DE IMPLANTES TEMPOS PÓS-OPERATÓRIOS	HOMÓGENOS				HETERÓGENOS			
	24 hs	48 hs	7 dias	14 dias	24 hs	48 hs	7 dias	14 dias
ESTRUTURAS OBSERVADAS NAS REAÇÕES HOSPEDEIRAS								
EXSUDATO RETICULAR DE FIBRINA	+++	+++++	++	+	+++	+++	+++	++++
LEUCÓCITOS NEUTRÓFILOS	+++	+++++	++	+	++++	++++	+++	++
OSTEOCLASTOS *	-	-	++	+++	-	-	+	+
LINFÓCITOS E PLASMÓCITOS	+	-	++	+++	-	-	+	+
TECIDO DE GRANULAÇÃO JOVEM	-	-	++++	+++	-	-	+++	++
FIBROBLASTOS	-	-	++++	++++	-	-	++	++
FIBRAS COLÁGENAS	-	-	+++	++++	-	-	+	++

\* - Os osteoclastos, referidos nesta e nas demais tabelas, foram visíveis somente no hospedeiro, fagocitando partículas ósseas esparsas.

LEGENDA:- - = ausência. + = quantidade mínima. ++ = quantidade pequena. +++ = quantidade moderada. ++++ = quantidade grande. +++++ = quantidade excessiva.

TABELA 2 - Análise quantitativa das estruturas observadas nas reações hospedeiras nos ratos do GRUPO II, que receberam implantes homogêneos e heterogêneos conservados em formol a 10% e lavados, em diferentes tempos pós-operatórios

TIPOS DE IMPLANTES TEMPOS PÓS-OPERATÓRIOS	HOMÓGENOS				HETERÓGENOS			
	24 hs	48 hs	7 dias	14 dias	24 hs	48 hs	7 dias	14 dias
ESTRUTURAS OBSERVADAS NAS REAÇÕES HOSPEDEIRAS								
EXSUDATO RETICULAR DE FIBRINA	+++	++	-	-	+++	+++	++	-
LEUCÓCITOS NEUTRÓFILOS	+++	++	+	-	++++	++++	++	-
OSTEOCLASTOS	-	-	++	++	-	-	++	+++
LINFÓCITOS E PLASMÓCITOS	+	+	+++	+++	-	+	++	++
TECIDO DE GRANULAÇÃO JOVEM	-	-	+++	++	-	-	++++	+++
FIBROBLASTOS	-	-	+++++	++++	-	-	++++	+++
FIBRAS COLÁGENAS	-	-	++++	+++++	-	-	+++	++++

LEGENDA: - = ausência, + = quantidade mínima, ++ = quantidade pequena, +++ = quantidade moderada, ++++ = quantidade grande, +++++ = quantidade excessiva.

TABELA 3 - Análise quantitativa das estruturas observadas nas reações hospedeiras nos ratos dos grupos I e II, que receberam respectivamente, implantes homogêneos e heterogêneos conservados em formol a 10% e não lavados e implantes homogêneos e heterogêneos conservados em formol a 10%, porém lavados, em diferentes tempos pós-operatórios (Estudo contínuo).

TIPOS DE IMPLANTES TEMPO PÓS-OPERATÓRIOS GRUPOS	HOMÓGENO								HETERÓGENO							
	24 horas		48 horas		7 dias		14 dias		24 horas		48 horas		7 dias			
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II		
ESTRUTURAS OBSERVADAS NAS REAÇÕES HOSPEDEIRAS																
EXUDATO RETICULAR DE FIBRINA	+++	+++	+++++	++	++	-	+	-	+++	+++	+++	+++	+++	+		
LEUCÓCITOS NEUTRÓFILOS	+++	+++	+++++	++	++	+	+	-	++++	++++	++++	++++	+++	+		
OSTEOCLASTOS	-	-	-	-	++	++	+++	++	-	-	-	-	+	+		
LINFÓCITOS E PLASMÓCITOS	+	+	-	+	++	+++	+++	+++	-	-	-	+	+	+		
TECIDO DE GRANULAÇÃO JOVEM	-	-	-	-	++++	+++	+++	++	-	-	-	-	+++	++		
FIBROBLASTOS	-	-	-	-	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-	++	++		
FIBRAS COLÁGENAS	-	-	-	-	+++	++++	++++	+++++	-	-	-	-	+	+		

LEGENDA: - = ausência, + = quantidade mínima, ++ = quantidade pequena, +++ = quantidade moderada, ++++ = quantidade grande, +++++ = quantidade excessiva.

3.4 - DOCUMENTAÇÃO FOTOMICROGRÁFICA

IMPLANTES CONSERVADOS EM FORMOL A 10% E NÃO LAVADOS

- Fig.1- Implante homogêneo 24 horas após o enxerto. HE - 32 x. Visão panorâmica, mostrando a relação entre o hospedeiro e o implante, sendo que o primeiro se situa no lado inferior esquerdo, enquanto que o segundo se localiza na parte central superior da fotomicrografia. No espaço compreendido entre essas estruturas, vêem-se as reações hospedeiras, nas quais se salientam espículas ósseas esparsas, representadas pelas imagens negras e de formas irregulares.
- Fig.2- Implante homogêneo 24 horas após o enxerto. HE - 128 x. Área do campo microscópico anterior, porém, em maior aumento. Note-se a presença de moderada quantidade de exsudato reticular de fibrina, que aparece como fibrilas tênues tingidas, entre moderada quantidade de neutrófilos, visíveis como pequenos pontos negros e arredondados, esparsos por todo o campo microscópico, mas, em especial, no centro do mesmo. Aparecem, nitidamente, as espículas ósseas descritas na figura anterior.
- Fig.3- Implante heterogêneo 24 horas após o enxerto. HE - 32x. Reações hospedeiras localizadas na parte superior da fotomicrografia e entre o tecido receptor, que se situa na parte inferior esquerda, e o implante, visível na porção inferior direita. Note-se que essas reações são mais extensas que as observadas junto ao implante homogêneo (fig. 1).
- Fig.4- Implante heterogêneo 24 horas após o enxerto. HE-128 x. Aspecto parcial, aumentado, do campo microscópico anterior. Vê-se, ainda, moderada quantidade de exsudato fibrinoso, mas grande quantidade de neutrófilos, cujas imagens fotográficas são análogas às descritas na fig. 2. Destacam-se, à direita da figura, inúmeras partículas ósseas.
- Fig.5- Implante homogêneo 48 horas após o enxerto. HE - 32 x. Presença de excessiva quantidade de fibrina, que toma quase que completamente o campo microscópico. Entre suas malhas, quase no centro da foto, há um microabcesso agudo, cuja imagem se assemelha a um borrão negro. Em cima, à direita, vê-se o implante.
- Fig.6- Implante homogêneo 48 horas após o enxerto. HE - 128 x. Aspecto central do microabcesso agudo, onde se observa excessiva condensação de neutrófilos. À direita, nota-se uma estreita faixa de exsudato reticular de fibrina.
- Fig.7- Implante heterogêneo 48 horas após o enxerto. HE - 32x. Quadro histopatológico análogo ao descrito na fig. 3, no qual se nota, entretanto, que as reações hospedeiras são mais limitadas.
- Fig.8- Implante heterogêneo 48 horas após o enxerto. HE-128 x. Visão parcial do campo microscópico anterior. Observam-se, à esquerda da figura, espículas ósseas, entre as quais há grande acúmulo de polimorfonucleares, sem, contudo, formarem microabscessos agudos. À direita e na parte inferior, vê-se o implante.

IMPLANTES CONSERVADOS EM FORMOL A 10% E NÃO LAVADOS

- Fig. 9- Implante homogêneo 7 dias após o enxerto. HE - 32 x.  
Nessa figura, o tecido receptor se localiza na porção superior, ao passo que o implante se dispõe no canto inferior direito. A estreita faixa granulosa, situada entre eles, representa a reação hospedeira.
- Fig. 10- Implante homogêneo 7 dias após o enxerto. HE - 128 x.  
Trecho das reações hospedeiras que são, predominantemente, proliferativas. No ângulo superior esquerdo, vê-se pequena porção do tecido hospedeiro, em cuja superfície notam-se muitos fibroblastos, intensamente corados e de formas características. Entre os mesmos, aparecem algumas fibras colágenas, tênues e tingidas, visíveis, sobretudo, no lado esquerdo da figura, imediatamente acima do número que a identifica. Observa-se, ainda, grande quantidade de tecido de granulação jovem, que se caracteriza pela presença de células arredondadas, intensamente coradas e sensivelmente maiores que os neutrófilos. Essas células arredondadas são responsáveis pelo aspecto granulomatoso visualizado na fig. 9. No ângulo inferior direito, vê-se um fragmento ósseo.
- Fig. 11- Implante heterogêneo 7 dias após o enxerto. HE - 32 x.  
Reação hospedeira semelhante à vista na fig. 9, porém, mais extensa. O tecido hospedeiro se situa à esquerda da foto, ao passo que o implante se localiza à direita da mesma.
- Fig. 12- Implante heterogêneo 7 dias após o enxerto. HE - 128x.  
Quadro histopatológico análogo ao descrito para o implante homogêneo (fig. 10). Evidencia-se, entretanto, pequena quantidade de neutrófilos situados à direita da fotomicrografia, cujo tamanho é sensivelmente menor que o das demais células redondas, localizadas à esquerda da figura.
- Fig. 13- Implante homogêneo 14 dias após o enxerto. Mall.-32 x.  
À direita da figura, salienta-se a formação de tecido fibroso, disposto, concêntricamente, ao redor do implante, caracterizando uma reação a corpo estranho, do tipo encapsulante. À esquerda, porção superior, nota-se o tecido ósseo receptor, que, nesse caso, é do tipo esponjoso. Logo abaixo desse tecido hospedeiro, observa-se tecido granulomatoso, similar ao revelado pelas figs. 9 e 11.
- Fig. 14- Implante homogêneo 14 dias após o enxerto. Mall.-128x.  
No centro do campo microscópico, vê-se grande quantidade de fibroblastos e fibras colágenas, que se orientam desordenadamente, salientando-se a presença de alguns osteoclastos. À direita, ângulo inferior, notam-se, entretanto, fibras colágenas dispostas, ordenadamente, em camadas.
- Fig. 15- Implante heterogêneo 14 dias após o enxerto. Mall.-32x.  
Reações hospedeiras sensivelmente retardadas em relação às demais, onde se vê apenas grande quantidade de exsudato fibrinoso. O implante situa-se na porção superior direita.
- Fig. 16- Implante heterogêneo 14 dias após o enxerto. Mall.-128x.  
Aspecto parcial, em maior aumento, do campo microscópico anterior, onde se distingue pequena quantidade de neutrófilos esparsamente distribuídos pelo campo, e, sobretudo, na porção superior direita. Vê-se, ainda, pequena quantidade de tecido de granulação, fibroblastos e fibras colágenas, especialmente na parte inferior da figura, cujas imagens se assemelham às descritas anteriormente.

### PRANCHA Nº 3

#### IMPLANTES CONSERVADOS EM FORMOL A 10% E LAVADOS

- Fig.17- Implante homogêneo 24 horas após o enxerto. HE - 32 x. Percebe-se, claramente, que as reações hospedeiras são bastante limitadas, confinando-se, entre o implante e o tecido ósseo receptor, localizados, respectivamente, à direita e à esquerda da foto. Assemelham-se, todavia, às vistas nos homogêneos não lavados.
- Fig.18- Implante homogêneo 24 horas após o enxerto. HE-128 x. Presença de moderada quantidade de exsudato de fibrina e leucócitos neutrófilos, claramente distinguíveis, entre o tecido receptor e o implante.
- Fig.19- Implante heterógeno 24 horas após o enxerto. HE-32 x. As reações hospedeiras, embora semelhantes, são mais intensas e extensas que as mostradas na fig. 17. Nesta figura, o implante aparece à direita da mesma.
- Fig.20- Implante heterógeno 24 horas após o enxerto. HE-128x. Nesta figura, a grande condensação de neutrófilos prejudica sua melhor visibilidade. Aparecem, entretanto, como grumos negros, principalmente à esquerda da foto. À direita, vê-se o implante, com partículas ósseas sobre sua superfície.
- Fig.21- Implante homogêneo 48 horas após o enxerto. HE - 32 x. Aspecto totalmente diverso dos homogêneos não lavados (fig. 5), porquanto não se vê a formação de microabcesso agudo. Nas reações hospedeiras situadas entre o implante (ângulo inferior direito) e o receptor (ângulo superior esquerdo), distinguem-se inúmeras espículas ósseas.
- Fig.22- Implante homogêneo 48 horas após o enxerto. HE-128 x. Pequena quantidade de exsudato de fibrina e neutrófilos, localizados à direita da figura. Destaca-se, à esquerda, a presença de inúmeras espículas ósseas esparsas.
- Fig.23- Implante heterógeno 48 horas após o enxerto. HE-32 x. Reações hospedeiras mais extensas que as do homogêneo, ao mesmo tempo pós-operatório. A estreita faixa situada ao lado esquerdo da figura, representa o hospedeiro, enquanto que à direita, porção superior, localiza-se o implante.
- Fig.24- Implante heterógeno 48 horas após o enxerto. HE-128x. Quantidade moderada de fibrina e grande quantidade de neutrófilos (agrupados à direita), que o distingue do homogêneo (fig. 22).

IMPLANTES CONSERVADOS EM FORMOL A 10% E LAVADOS

- Fig.25- Implante homogêneo 7 dias após o enxerto. HE - 32 x. Aspecto panorâmico da relação entre o hospedeiro e o implante. Note-se a camada de tecido granulomatoso que se dispõe, concêntricamente, entre o implante e o hospedeiro. O primeiro se situa no lado superior da foto, enquanto que o segundo se localiza no lado inferior.
- Fig.26- Implante homogêneo 7 dias após o enxerto. HE - 128 x. Quantidade excessiva de fibroblastos e grande quantidade de fibras colágenas entre eles, sobretudo na porção superior da fotomicrografia. Na porção inferior central, aparece mínima quantidade de neutrófilos.
- Fig.27- Implante heterógeno 7 dias após o enxerto. HE - 32x. Implante, à direita, bem afastado do hospedeiro, à esquerda. Reação hospedeira análoga àquela observada na fig. 25.
- Fig.28- Implante heterógeno 7 dias após o enxerto. HE-128x.\*\* Presença de grande quantidade de neutrófilos (situados à direita).
- Fig.29- Implante homogêneo 14 dias após o enxerto. HE - 32 x. Reações exclusivamente proliferativas entre o implante e o tecido receptor, que assume aspecto granuloso. O implante se localiza no ângulo superior direito. Conseqüentemente, a estrutura óssea, que se observa à esquerda, é o receptor.
- Fig.30- Implante homogêneo 14 dias após o enxerto. HE - 128x. Vê-se uma capa fibrosa entre o implante e o hospedeiro, constituída quase que exclusivamente de fibras colágenas, dispostas em cordões concêntricos, notadamente junto ao tecido receptor. É pequena a quantidade de tecido de granulação, que se localiza, junto ao implante. Ausência de neutrófilos.
- Fig.31- Implante heterógeno 14 dias após o enxerto. Mall.32x. Reação hospedeira mais extensa que as antecedentes. Vê-se, apenas, o implante, à direita da foto.
- Fig.32- Implante heterógeno 14 dias após o enxerto. Mall.128x. Vê-se moderada quantidade de tecido de granulação jovem, onde se localiza moderado número de osteoclastos, reabsorvendo partículas ósseas esparsas (centro da foto). À direita, grande quantidade de fibras colágenas, dispostas em camadas e em íntima relação com o implante. Ausência de neutrófilos.

---

\*\* = A ampliação da área da fotomicrografia 27 (fig.28), não representa a reação hospedeira predominante. Por infelicidade, apanhamos uma área localizada, rica em neutrófilos, dando a falsa idéia da predominância destas células sobre os processos proliferativos, o que, na realidade, não ocorreu.

#### 4 - DISCUSSÃO

Pelos resultados apresentados, verificou-se que, tanto os implantes homógenos e heterógenos conservados em formol a 10% e não lavados, como os implantes similares, porém lavados, comportaram-se como corpos estranhos, sendo englobados pelos hospedeiros, através de reações inflamatórias e proliferativas fibrosas. Essas reações, entretanto, variaram de acôrdo com o tipo de tratamento a que os implantes foram submetidos (lavados ou não lavados), ou de acôrdo com a origem dos mesmos (homógenos ou heterógenos). Com efeito, verificou-se que, frente aos implantes não lavados, sobretudo nos heterógenos, as reações proliferativas hospedeiras não foram intensas, ao passo que as inflamatórias agudas persistiram até 14 dias após os enxertos. Tal fato indicou-nos que os implantes não lavados não foram bem tolerados pelo organismo receptor, apresentando, outrossim, fenômenos de rejeição inflamatória até o tempo em que duraram nossas experiências. Reações hospedeiras análogas foram descritas por: SIERRA (1954), ao empregar enxertos heterógenos congelados e "os purum", BELL e col. (1958), GILBERTSON & CLARK Jr. (1959), KENNEDY & WELLINGTON (1963) e FREIBERG & RAY (1964). Já as reações hospedeiras decorrentes dos implantes lavados, aos 14 dias, diferiram das provocadas pelos implantes não lavados em dois pontos básicos: não exibiram células inflamatórias do tipo agudo (neutrófilos) e, ao contrário, mostraram grande quantidade de tecido fibroso, disposto, concêntricamente, entre êsses implantes e o tecido hospedeiro. Quadros histopatológicos semelhantes foram descritos por: CAMPBELL e col.

(1953), ao estudarem as reações hospedeiras provocadas por enxertos desvitalizados (congelados, fervidos e "os purum") e homogêneos frescos, BELL (1959), MURRAY e col. (1960) e STICKEL (1961). Durante todo o período experimental, tanto os implantes não lavados como os lavados, não foram reabsorvidos e nem induziram osteogênese hospedeira. Suas estruturas histológicas também permaneceram inalteradas, fato comprovado pela ausência de caracteres tintoriais menos visíveis. Constatou-se, entretanto, que, nos implantes lavados, a reorganização hospedeira deu-se mais precocemente do que nos implantes não lavados. Tal fato, aliado à ausência de resposta inflamatória, indicou-nos que os implantes homogêneos e heterogêneos lavados foram menos irritantes, comportando-se como corpos estranhos inertes, relativamente bem tolerados pelo organismo receptor. Assemelham-se, então, às próteses internas não reabsorvidas, descritas por SIERRA (1954), a propósito do comportamento de enxertos corticais homogêneos e heterogêneos liofilizados. O comportamento de implantes conservados como corpos estranhos inertes foi descrito, também, por KRAMER & WRIGHT (1963) e KRAMER e col. (1964), ao utilizarem o osso "anorgânico" e por WESTERHOLM (1963), ao empregar o "Ossar".

A questão de inespecificidade dos enxertos conservados pelos diversos métodos físico-químicos, isto é, idênticas reações hospedeiras quer se tratem de homo ou heteroimplantes, é bastante controversa. Assim, JUDET & ARVISET (1949) e JUDET e col. (1952), partidários dessa inespecificidade, afirmaram que a congelação "despersonaliza" de qualquer maneira os enxertos; estes perderiam, então, sua especificidade, permiti-

tindo a mesma tolerância, pelo organismo, tanto dos ho-  
mo quanto dos heterotransplantes. Também VALENTIN & LA-  
PRAS (1959), empregando enxertos liofilizados, concluí-  
ram que a sua procedência (heterógena ou autógena) per-  
dia muito de seu interêsse, porque os heterotransplan-  
tes liofilizados se comportavam como os autógenos. Ao  
empregarem implantes fetais autógenos, homogênos e he-  
terógenos tratados por diversos processos físico-quími-  
cos, CASUCCIO & VIGLIANI (1959) não encontraram, tam-  
bém, diferenças significativas no comportamento dos ho-  
mo e heteroimplantes. Ao contrário, SIERRA (1954), usan-  
do diversos tipos de enxertos conservados ou modifica-  
dos (congelados, liofilizados, conservados em mertiola-  
to e o "os purum"), concluiu que os implantes heteróge-  
nos, comparativamente aos homogênos, exibiram menor grau  
de reabsorção nos estágios iniciais; da mesma forma, -  
houve retardamento na reabsorção total dêsses implantes.  
Acrescentou, ainda, que a natureza heteroplástica dos  
enxertos conservados têm implicado em neo-formações ós-  
seas mínimas. BLAIMONT (1960), por sua vez, demonstrou  
que a ebulição não priva de especificidade a substân-  
cia óssea, pois ao passo que os heteroenxertos fervi-  
dos se comportavam como seqüestros bem tolerados, os  
homoenxertos, ao contrário, nas mesmas condições expe-  
rimentais, foram satisfatoriamente assimilados pelo  
hospedeiro. Idêntica opinião foi emitida por CABITZA  
(1959), ao utilizar enxertos ósseos congelados. Os re-  
sultados obtidos no presente estudo foram análogos às  
observações de SIERRA (1954), CABITZA (1959) e BLAI-  
MONT (1960). Com efeito, tanto os implantes homogênos  
e heterógenos não lavados, como os implantes similares,  
porém lavados, exibiram diferentes tipos e graus de

reações hospedeiras. Assim, dentro de cada grupo analisado e a cada tempo pós-operatório, os implantes homogênos foram melhor aceitos pelo organismo hospedeiro do que os heterógenos. Essa afirmação fundamentou-se no fato de que os homogênos demonstraram menor resposta inflamatória e maior proliferação fibroblástica hospedeira do que os heterógenos. A discrepância observada 48 horas após os enxertos, entre os implantes homogênos e heterógenos não lavados, pode ser atribuída a reações hospedeiras individuais mais acentuadas devido a estímulos mecânicos de maior intensidade, decorrentes da perfuração óssea praticada. Todavia, não se pode excluir a possibilidade de uma contaminação externa, embora não houvessem indícios clínicos que a pudessem caracterizar. Pareceu-nos, então, que, embora tratando-se de implantes desvitalizados, a diferença de espécie entre os doadores e os receptores, influiu na menor ou maior tolerância hospedeira dos mesmos. A pretensa inespecificidade dos enxertos conservados por diferentes processos físico-químicos, advogada por JUDET & ARVISET (1949), JUDET e col. (1952), VALENTIN & LAPRAS (1959) e CASUCCIO & VIGLIANI (1959), não foi observada nos implantes conservados em formol a 10%, lavados ou não lavados.

Os resultados obtidos com implantes conservados em "merthiolate" (REYNOLDS e col. - 1953 e KRØMER - 1963), acetona (SABANAS e col. 1955 a) e acetona associada ao formol (SABANAS e col. - 1955 b e GAFFNEY e col. - 1958), embora controvertidos, demonstraram que os mesmos foram bem aceitos pelo hospedeiro, com ausência de reação a corpo estranho, sendo incorporados, rápida ou tardiamente, ao tecido receptor. Os implantes conservados em formol a 10%, entretanto, diferiram dos

519/745

anteriormente descritos, por permanecerem não reabsorvidos e incapazes de estimularem osteogênese hospedeira, exibindo, ao contrário, reações a corpo estranho do tipo fibroso. A etiologia dessa reação a corpo estranho ainda nos pareceu obscura. ORELL (1934, 1937) afirmou que o calor e os agentes químicos agiriam sobre o tecido ósseo, provocando sua morte e subsequente formação de corpos estranhos albuminosos, aos quais os organismos hospedeiros tenderiam a reagir. Já CABITZA (1959) relatou que as reações de intolerância imunológica vistas nos enxertos frescos substituem-se nos implantes desvitalizados, por uma reação a corpo estranho, na qual se forma um tecido conjuntivo fibroso, sem reabsorção e neo-aposição óssea. Contrariamente, ENNEKING (1962) relatou que certos princípios imunológicos têm sido verificados nos implantes desvitalizados pelos diversos meios físico-químicos. Comparou-os, também, a outros tecidos que provocam o mecanismo de rejeição dos transplantes, que, histopatologicamente, se caracterizam por resposta inflamatória hospedeira.

Baseados na presente investigação experimental, podemos deduzir que os implantes conservados em formol a 10% não são viáveis como materiais de implante. Essa afirmativa, entretanto, não nos parece definitiva ou irredutível. Com efeito, embora não fôsse objetivo do presente trabalho, realizamos quatro implantes, dois dos quais foram lavados (homógeno e heterógeno) e os dois outros não (também homógeno e heterógeno), deixando-os em evolução até 90 dias após os enxertos, tempo em que os animais receptores foram sacrificados. Exames microscópicos dos cortes obtidos desses espécimens revelaram, tanto nos implantes heterógenos lavados e

não lavados, como no homogêneo não lavado, uma delgada capa fibrosa circundando os implantes e retendo-os firmemente ao tecido hospedeiro, com ausência de fenômenos de reabsorção e neo-aposição óssea. Trataram-se, sem dúvida, de reações a corpo estranho parecidas com as descritas nos implantes similares, com 14 dias de evolução pós-operatória. O implante homogêneo lavado, entretanto, surpreendentemente, demonstrou quadro histopatológico totalmente diverso dos demais. Ao invés do tecido conjuntivo fibroso descrito, o hospedeiro exibiu um tecido ósseo, trabeculado jovem, nitidamente mais basófilo que o do implante, que o englobava intimamente. Na superfície do implante foram visto alguns osteoclastos, iniciando, provavelmente, o processo de reabsorção do mesmo. Não cremos que se tratasse de reação hospedeira individual, já que o mesmo animal abrigou, também, o implante heterogêneo lavado, - que, no entanto, não exibiu reação semelhante. Parece-nos que, sob determinadas condições, que não pudemos precisar, o implante homogêneo lavado foi capaz de induzir osteogênese hospedeira. Esse fato, aliado às inúmeras controvérsias surgidas na utilização de implantes conservados ou obtidos por diferentes métodos, leva-nos a admitir que novos estudos deverão ser realizados, com o objetivo de determinar a viabilidade ou não dos implantes homogêneos conservados em formol a 10% e lavados antes de sua inserção no organismo - hospedeiro.

## 5 - CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos com os diversos tipos de implantes conservados em formol a 10%, bem como na análise comparativa com os demais implantes descritos na literatura, é possível estabelecer as seguintes conclusões:

1. Os implantes conservados em formol a 10% comportaram-se como corpos estranhos, provocando, no hospedeiro, reações de graus variáveis, segundo o tipo de implante utilizado.

2. Os implantes não lavados permaneceram intolerados pelo organismo receptor, com fenômenos de rejeição inflamatória, ao passo que os lavados, nas mesmas condições experimentais, comportaram-se como corpos estranhos inertes, relativamente bem tolerados.

3. A pretensa inespecificidade dos enxertos conservados por diferentes métodos físico-químicos, isto é, idênticas reações hospedeiras quer se tratem de homo ou heteroimplantes, não foi observada nos implantes conservados em formol a 10%, lavados ou não lavados. Com efeito, dentro de cada grupo analisado, e a cada tempo pós-operatório, os implantes homogêneos foram melhor aceitos pelo organismo hospedeiro do que os heterógenos.

4. Baseado na presente investigação, podemos concluir pela não viabilidade dos implantes conservados em formol a 10%, como materiais de implante.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBEE, F.H. (1915) - Bone graft surgery. 1a. ed., Philadelphia, Saunders. Apud HINDS, E.C. (1962).
- ANDERSON, K.J., SCHMIDT, J. & LeCOCQ, J.F. (1959) - The effect of particle size of the heterogenous-bone-transplant on the host tissue vascular penetration. J.Bone Jt.Surg., 41-A: 1455-1468.
- ANDERSON, K.J., LeCOCQ, J.F. & MOONEY, J. G. (1963) - Clinical evaluation of processed heterogenous bone transplants. Clin.Orthop., 29: 248.
- BARROS, J.J. (1966) - Transplantes, implantes ósseos e derivados. Revisão da literatura. Revta.bras.odont., 23: 526-532.
- BASSETT, C.A.L. & RUEDI-LINDECKER, A. (1964) - Bibliography of bone transplantation. Transplantn.Bull., 2: 668-679.
- BELL, W. H. (1959) - Histologic study of heterogenous bone implants in human beings: preliminary report. J.oral Surg.Anesth.Hosp.dent.Serv., 17: 3-13.
- (1961) - Use of heterogenous bone in oral surgery. J.oral Surg.Anesth.Hosp.dent.Serv., 19: 459-474.
- BELL, W.H., HINDS, E.C. & ARNIM, S.S. (1958) - Histologic comparison of bovine and anorganic bone implants in human beings. J.dent.Res., 37: 45. Abs..
- BEUBE, F.E. & SILVERS, H.F. (1936) - Further studies on bone generation with use of boiled heterogenous bone. J.Periodont., 7: 17-21.
- BLAIMONT, P. (1960) - Contribution experimentale à l'étude des greffes osseuses bouillies. Acta.chir.belg., 59: 871-885.

- BOUTET, M. (1959) - Recherches expérimentales sur les hétérotransplants osseux. Rev.Chir.orthop., 45:41-48.
- BOYNE, P.J. (1958) - Treatment of oral defects in man with anorganic heterogenous bone. Oral Surg., 11: 322-329.
- BOYNE, P.J. & LOSEE, F.L. (1957 a) - Response of oral tissues to grafts of ethylenediamine treated heterogenous bone. Naval Med.Res.Inst., Project NM - 004.006.09.02, 15: 283-310.
- (1957 b) - Use of anorganic heterogenous bone in oral bony defects. U.S.arm. Forces med.J., 8: 789-794.
- (1958) - The use of anorganic bone implants in oral surgery. J.oral Surg., 16:53-62.
- BOYNE, P.J. & LYON, H.W. (1959) - Long-term histologic response to implants of anorganic heterogenous bone in man. J.dent.Res., 38: 699. Abs..
- BOYNE, P.J., LYON, H.W. & LOSEE, F.L. (1958) - Responses of oral tissues to grafts of heterologous anorganic bone. III. Human host response to implants of anorganic bovine bone. J.dent.Res., 37:45. Abs..
- BURKE, R.J. & CLARK, Jr., H.B. (1959) - Use of anorganic bone to increase ridge height in dog jaws. - J.dent.Res., 38: 697-698. Abs..
- BURWELL, R.G. (1964) - Biological mechanisms in foreign bone transplantation. In: Modern trends in orthopaedics. 4a. ed., London, Clark, p. 63.
- BUSH, L.F. & GARBAR, C.Z. (1948) - The bone bank. J.Am.med.Ass., 137: 588-594.
- CABITZA, A. (1959) - Sulle qualità ricettive e sul con

- cetto di morte dell'eterotrapianto osseo. Rass.med. sarda, 61: 463-478.
- CAMPBELL, C.J., BROWER, T., MAC FADDEN, D.G., PAYNE, E. B. & DOHERTY, J. (1953) - Experimental study of the fate of bone grafts. J.Bone Jt.Surg., 35-A:332-346.
- CARVALHO, E.T., BATALHA, E.S.C. & ANDREUCCI, M. (1952)- Emprêgo de osso conservado em cirurgia ortopédica. Banco de osso. Revta.Hosp.Clin.Fac.Med.Univ.S.Paulo, 7: 121-134.
- CARVALHO, M.I. & COURA, Z.F. (1965) - Resultados clínicos com heterotransplantes de osso preparado. Bo-plant. Hospital, Rio de J., 67: 95-117.
- CASANUEVA DEL C., M. & VELASCO S., A. (1942) - El injer to de hueso heterologo muerto, en cirugia; estado actual del problema; preparación del "Os purum" de Orell. Revta.méd.Chile, 70: 424-428.
- CASUCCIO, C. & VIGLIANI, F. (1959) - Remarques histologiques sur le sort des greffes osseuses expérimentales. Rev.Chir.orthop., 45: 51-57. Suppl..
- ENNEKING, W.F. (1962) - Immunologic aspects of bone transplantation. Sth.med.J., Nashville, 55:894-900.
- FREIBERG, R.A. & RAY, R.D. (1964) - Studies of devitalized bone implants. Archs.Surg., Chicago, 89:417-427.
- FREIDEL, C. (1957) - L'utilization des greffons hétérogènes réfrigérés en chirurgie maxillo-faciale. Annls. odonto-stomat., 13: 101-121.
- GAFFNEY, D.D., ROYER, R.Q., DOCKERTY, M.B. & LIPSCOMB, P.R. (1958) - Acetone-preserved bank bone in reconstruction of the mandibular ridge. Oral Surg., 11: 792-797.
- GALLIE, W.E. (1918) - Boiled bone in operative surgery. Am.J.orth.Surg., 16: 373-383.

- GEORGIADIS, N., WOOLF, R., RICHARD, F. & PICKRELL, K. - (1959) - Use of bovine bone in reconstructive surgery. Plastic reconstr.Surg., 24: 13-18.
- GILBERTSON, B.A. & CLARK Jr., H.B. (1959) - Effect of osteogen in extraction sockets of rats. J.dent.Res., 38: 697. Abs..
- GRESHAM, R.B. & THOMAS, E.D. (1962) - A comparative study of the early phases of transplanted bone autografts, freeze-dried homografts, and processed calf heterografts. Surg.Forum., 13: 452-454.
- GUILLEMINET, M., STAGNARA, P. & DUBOST-PERRET, T. (1953) - Preparation and use of heterogenous bone grafts. J.Bone Jt.Surg., 35-B: 561-567.
- HALLÉN, L.G. (1966) - Heterologous transplantation with Kiel bone. Acta orthop.scand., 37: 1-19.
- HANCOX, N.M., OWEN, R. & SINGLETON, A. (1961) - Cross-species of deproteinised bone. J.Bone Jt.Surg., - 43-B: 152-161.
- HAYWARD, J.R., COSTICH, E.R. & AVERY, J.K. (1958) - The use of inorganic beef bone matrix in oral surgery. J.dent.Res., 37: 46. Abs..
- HINDS, E.C. (1962) - Bone grafts: indications and timing. J.oral Surg.Anesth.Hosp.dent.Serv., 20: 298-315.
- HUEBSCH, R.F. (1954) - The use of cortical bone to stimulate osteogenesis. Oral Surg., 7: 1273-1275.
- INCLAN, A. (1942) - The use of preserved bone grafts in orthopedic surgery. J.Bone Jt.Surg., 24-A: 81.
- JUDET, J., LAGRANGE, J. & DUNOYER, J. (1952) - Hétéro-transplants osseux congelés. Mém.Acad.Chir., 78: - 919-924.
- JUDET, R. & ARVISET, A. (1949) - Banque d'os et hétéro-

- greffe. Presse méd., 57: 1007.
- KARGES, D.E., ANDERSON, K.J., DINGWALL, J.A. & JOWSEY, J. (1963) - Experimental evaluation of processed heterogenous bone transplants. Clin.Orthop., 29: 230-247.
- KENNEDY, D.R. & WILLINGTON, J.S. (1963) - Use of despeciated calf bone in freshly prepared tooth sockets and mandibular defects in dogs. J.dent.Res., 42: 599-604.
- KLEINBERG, S. (1954) - Heterogenous bone. Substitute for human bone. Bull.Hosp. Jt.Dis., N.Y., 15: 169.
- KRAMER, I.R.H. & WRIGHT, H.C. (1963) - Long-term studies on anorganic bovine bone implants in sheep. J.dent.Res., 42: 1113. Abs..
- KRAMER, I.R.H., KILLEY, H.C. & WRIGHT, H. C. (1964) The pattern of healing following implantation of heterogenous anorganic compact bone in sheep. - Archs.oral Biol., 9: 671-684.
- KRØMER, H. (1963) - Bone homografts in minor oral surgery. Dent.Abtr., Chicago, 8: 161-162.
- LLOYD-ROBERTS, G.C. (1952) - Experiences with boiled cadaveric bone. J.Bone Jt.Surg., 34-B: 428-432.
- LOSEE, F.L. & HURLEY, L.A. (1956) - Successful cross-species bone grafting accomplished by removal of the donor organic matrix. Naval Med.Res.Inst., Project NM 004.006.09.01, 14: 911-948.
- LYON, H.W. (1959) - Host response to implants of heterogenous anorganic bone. J.dent:Res., 38: 699. Abs..
- LYON, H.W. & LOSEE, F.L. (1958) - Response of oral tissues to grafts of heterologous anorganic bone. II. Host response to implants of anorganic bovine spongy bone. J.dent.Res., 37: 44-45. Abs..

- MACEWEN (1878) - Apud HINDS, E.C. (1962).
- MEEKEREN, J.J., Van (1668) - Heelengeneeskunstige aanmerkingen. Amsterdam, C. Commelijin. In. Garrison's Medical Bibliography. 2a. ed., London Grafton & Co., 1955, p. 504.
- MELCHER, A.H. (1962) - The use of heterogenous anorganic bone as an implant material in oral procedures. Oral Surg., 15: 996-1000.
- MELCHER, A.H. & IRVING, J.T. (1963) - The effect of implanting various substances into artificially created circumscribed defects in rat femurs. J.Bone Jt. Surg., 45-B: 162-175.
- MILLONING (1962) - Apud CARVALHO, M.I. & COURA, Z.F. - (1965).
- MURRAY, J.W., SAVINE, L.S. & WARREN, R.F. (1960) - Comparative study of healing of organic and anorganic bone grafts. N.Y. St.J.Med., 60: 3617-3620.
- NEVINS, L.M., STAHL, S.S. & SORRIN, S. (1961) - The response of experimentaly injured alveolar bone to cultured calf bone implantation in dogs. Oral Surg., 14: 1256-1263.
- NUBOER, J.F. (1954) - Treatment of certain coarctations with homologous grafts, fix in four per cent formalin. Arch.chir.neerl., 6: 123-142.
- OLLIER, L. (1860) - Recherches expérimentales sur les greffes osseuses. J.Physiol. l'Homme animaux, 3: 88.
- ORELL, S. (1934) - Interposition of "os purum" in osteosynthesis after osteotomy resections of bones and joints (interposition osteosynthesis). Surgery Gynec. Obstet., 59: 638.
- (1937) - Surgical bone grafting with "os purum", "os novum", and "boiled bone". J.Bone Jt.Surg.,

- 19: 873-885.
- RAY, R.D., DEGGE, J., GLOYD, P. & MOONEY, G. (1952) - Bone regeneration: an experimental study of bone-grafting materials. J.Bone Jt.Surg., 34-A: 638-647.
- REGOLI, G. (1922) - Innesti di tessuti fissati e conservati. Policlínico (sez.chir.), 30-C: 559-574.
- REYNOLDS, F.C., OLIVER, D.R. & ROMNEY, R. (1953) - Bone grafts. Dent.Dig., 59: 183-184. Abs..
- ROMEIS, B. (1928) - Inclusion en parafina. In: Guia formulário de técnica histológica. 11a. ed., Barcelona, Labor, p. 83.
- SABANAS, A.O., JANES, J.M., DAHLIN, D.C. & HEILMAN, F. R. (1955 a) - Comparison of homologous bone grafts preserved by acetone and by freezing: experimental and bacteriologic studies. Proc.Staff.Meet.Mayo Clin., 30: 422-432.
- 
- (1955 b) - Comparison of homologous bone grafts preserved by acetone and formaldeyde and by acetone alone: experimental studies. Proc.Staff.Meet.-Mayo Clin., 30: 432-436.
- SCOPP, I.W., KASSOUNY, D.Y. & MORGAN, F.H. (1966) - Bovine bone (Boplant). J.Periodont., 37: 400-407.
- SHANKWALKER, G.B. & MITCHELL, D.F. (1958) - Response to despeciated calf bone and calcium hydroxide implants. J.dent.Res., 37: 981. Abs..
- SICARD, A. & MOULY, R. (1954) - Greffons osseux homogènes congelés; Etude de 620 cas opérés avec la banque d'os. Press méd., 62: 865-866.
- SIERRA, L.P. (1954) - Evolucion histologica comparada de los injertos oseos conservados; estudio experi-

- mental. Acta ortopéd.-traum.ibér., 2: 246-275.
- STAGNARA, P. & DUBOST-PERRET, T. (1950) - Greffes osseuses: transplants homogènes et hétérogènes. Rev. Chir.orthop., 36: 404-416.
- STICKEL, F.R. (1961) - A quantitative study of bone regeneration in the rat calvarium after decalcified bone matrix implantation. J.dent.Res., 40: 674. Abs..
- TUCKER, E.J. (1953) - Preservation of living bone in plasma. Surgery Gynec.Obstet., 96: 739.
- (1956) - Studies of the use of cultured calf bone in human bone grafts. Clin.Orthop., 7: 171-188.
- TURNER, T.C., BASSETT, C.A.L., PATE, J.W. & SAWYER, P. N. (1955) - An experimental comparison of freeze-dried and frozen cortical bone-graft healing. J. Bone Jt. Surg., 37-A: 1197-1205.
- URIST, M. (1960) - Transplants, implants, derivatives and substitutes. A survey of research of the past decade. Instruct.Course.Lect.Am.Acad.orthop.Surg., 17: 184-195.
- VALENTIN, F. & LAPRAS, A. (1959) - Expérimentation sur les transplants osseux hétéroplastiques. Rev.Chir.orthop., 45: 22-36. Suppl..
- VALENTIN, F. & LARCHER, A. (1959) - Préparation par cryodessiccation. Rev.Chir.orthop., 45:19-21, Suppl.
- VIIKARI, S.J. & AHO, A.J. (1963) - The use of heterogeneous, anorganic bone as grafting material for osseous defects. Annls.Chir.Gynaec.Fenn., 52:665-678.
- WALTHER, P., von (1821) - Widereinheilung bei der trepanation ausgebohrten knochenscheibe. J.Chir. - Augenhk., 2: 571.

WESTERHOLM, N. (1963) - Grafting with inorganic, heterogenous bone. Dent. Abstr., Chicago, 8: 501-502.

WILSON, P.D. (1947) - Experiences with a bone bank, Ann. Surg., 126: 932-946.

\*

\*

\*