

# ENXERTO BOVINO LIOFILIZADO: COMPORTAMENTO HISTOLÓGICO APÓS SEGUIMENTO DE 49 MESES EM SERES HUMANOS

*BOVINE LYOPHILIZED GRAFT (BLG): HISTOLOGICAL ANALYSIS ON BEHAVIOR IN HUMANS AFTER 49 MONTHS*

Carlos Roberto Galia<sup>1,2</sup>, Giuseppe De Luca Júnior<sup>3</sup>, Luiz Müller Ávila<sup>3</sup>, Ricardo Rosito<sup>1,4</sup>, Carlos Alberto Souza Macedo<sup>1,2</sup>

## RESUMO

**Objetivo:** Analisar o comportamento histológico do ELB, produzido conforme protocolo desenvolvido pelo autor principal, em seres humanos no decorrer de 49 meses através da aferição da proporção enxerto/osso neoformado em relação ao total de área mineralizada. **Métodos:** Série de casos com 12 pacientes, oito femininos (66%) e quatro masculinos (34%), totalizando 13 biópsias, nos quais utilizou-se ELB e que posteriormente houve necessidade de reintervenção cirúrgica, no período de 2000 a 2011. As lâminas produzidas, coradas com hematoxilina-eosina (HE), foram analisadas por patologista e digitalizadas para a avaliação proposta. **Resultados:** A média etária foi de 57 anos e o tempo médio de seguimento de 49 meses (6-115). A proporção média de ELB foi de 42% (13-85) e de osso neoformado de 58% (15-87) em relação ao total de área mineralizada. **Conclusões:** O presente estudo demonstra que o ELB utilizado apresenta característica osteocondutora e biocompatibilidade. O ELB apresentado é opção terapêutica a ser utilizada em cirurgias ortopédicas que necessitem preenchimento de deficiências ósseas.

**Descritores** – Transplante Ósseo; Humanos; Liofilização.

## ABSTRACT

**Objective:** To analyze the histological behavior of bovine lyophilized grafts (BLG) produced according to a protocol developed by the first author, in humans over a 49-month period by measuring the graft/bone neoformation ratio in relation to the total mineralized area. **Methods:** This was a case series involving 12 patients: eight females (66%) and four males (34%), totaling 13 biopsies. BLG was used, and surgical reintervention was subsequently required during the period 2000 to 2011. The slides produced were stained with hematoxylin-eosin (HE), were analyzed by a pathologist and were digitized for the proposed evaluation. **Results:** The mean age was 57 years and the mean follow-up was 49 months (range: 6-115). The average proportion of BLG was 42% (range: 13-85) and neoformed bone, 58% (range: 15-87) in relation to the total area mineralized. **Conclusions:** This study demonstrated that the BLG used presented osteoconductive characteristics and biocompatibility. BLG is a therapeutic option that can be used in orthopedic surgery in which bone defects need to be filled.

**Keywords** – Bone Transplantation; Human; Freeze Drying

## INTRODUÇÃO

A utilização de transplantes ósseos em cirurgias ortopédicas e odontológicas tornou-se indispensável em diversos

procedimentos, dentre os quais as revisões de artroplastia total de quadril (RATQ) e de joelho (RATJ)<sup>(1-3)</sup>. O tecido ósseo, apesar do alto poder de reparo, nem sempre

1 - Ortopedista do Grupo de Cirurgia do Quadril do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS); Professor do Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da UFRGS – Porto Alegre, RS, Brasil.

2 - Doutor em Cirurgia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Porto Alegre, RS, Brasil.

3 - Ortopedista com Residência Médica concluída no Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Porto Alegre, RS, Brasil.

4 - Mestre em Cirurgia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Porto Alegre, RS, Brasil.

5 - Chefe do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – Porto Alegre, RS, Brasil.

Trabalho realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Porto Alegre – RS.

Correspondência: Rua Ramiro Barcelos, 2,350, Sala de Gesso – Andar Térreo, Largo Eduardo Zaccaro Faraco – 90035-903 – Porto Alegre, RS. E-mail: giujr@hotmail.com, galia@portoweb.com.br

Trabalho recebido para publicação: 12/02/2012, aceito para publicação: 12/04/2012.

Os autores declaram inexistência de conflito de interesses na realização deste trabalho / *The authors declare that there was no conflict of interest in conducting this work*

Este artigo está disponível online nas versões Português e Inglês nos sites: [www.rbo.org.br](http://www.rbo.org.br) e [www.scielo.br/rbort](http://www.scielo.br/rbort)  
This article is available online in Portuguese and English at the websites: [www.rbo.org.br](http://www.rbo.org.br) and [www.scielo.br/rbort](http://www.scielo.br/rbort)

responde adequadamente quando acometido por extensas osteólises<sup>(4)</sup>. Nesses casos, altamente prevalentes em ortopedia, há necessidade da busca de substitutos ósseos de alta qualidade ou por outros biomateriais que possam preencher e restabelecer estas lacunas<sup>(4)</sup>. Um fator determinante relacionado à qualidade de um enxerto como substituto ósseo é o processo de neoformação óssea desencadeado no hospedeiro<sup>(5)</sup>. Os eventos biológicos responsáveis pela osteointegração são osteogênese, osteoindução e osteocondução<sup>(4)</sup>. A biópsia é o método padrão ouro para determinar os fenômenos ocorridos no enxerto, sendo que os estudos radiográficos apenas fornecem uma ideia macroscópica do que ocorre microscopicamente.

Atualmente estão disponíveis diferentes tipos de enxertos ósseos para cirurgias ortopédicas reconstrutivas: autólogos, homólogos e heterólogos – xenogênicos –, podendo ser esterilizados e preservados por congelamento ou liofilização, entre outros meios<sup>(5-9)</sup>. O enxerto autólogo é considerado, sob o ponto de vista de integração, o substituto ideal e preferencial; entretanto, limitações como quantidade disponível e o risco de complicações – locais e sistêmicas, variando de 21% a 49% – são inerentes à intervenção necessária para sua retirada, restringindo sua aplicabilidade<sup>(1,10,11)</sup>. O alogênico congelado é bastante utilizado nas RATQ, mas nem sempre está disponível, além de, apesar de rígidos controles, acarretar riscos de transmissão de doenças infecto-contagiosas e tumorais<sup>(6,12-14)</sup>. Os enxertos heterólogos, especificamente enxerto liofilizado bovino (ELB), são uma opção que vem sendo utilizada em diversas áreas médicas, em razão da fácil obtenção, grande disponibilidade e alta similaridade com o osso humano<sup>(6)</sup>. Para diminuir a antigenicidade e preservar apenas a matriz proteico-mineral, o ELB é lavado, decelularizado e desengordurado, sendo desidratado após. O osso bovino – matéria-prima para obtenção do enxerto proposto – possui composição química, porosidade, tamanho, forma e comportamento biológico semelhantes ao humano, fornecendo estrutura de suporte e osteocondução, além de prover alto conteúdo de cálcio e fósforo, os quais são essenciais para a neoformação do tecido ósseo<sup>(4)</sup>. Diversos trabalhos mostram experiências desse tipo de enxertia em animais<sup>(15-19)</sup>; entretanto, somente um realizou análises histológicas em humanos<sup>(20)</sup>. Os resultados dos estudos em animais dificilmente são aplicáveis em humanos devido às diferenças físico-biológicas existentes. Assim, trabalhos que venham a elucidar o comportamento de xenoenxertos em seres humanos são de grande valia.

A hipótese fundamental do trabalho relacionada ao

uso do ELB produzido conforme protocolo desenvolvido pelo autor principal é sua aplicabilidade como suporte estrutural temporário que permita a osteocondução e a integração do osso neoformado nas áreas deficientes, promovendo um preenchimento satisfatório. Nosso estudo se justifica já que há pouca informação detalhada a respeito do tema e os dados disponíveis são controversos<sup>(17-22)</sup>.

O presente estudo tem como objetivo analisar o comportamento histológico deste ELB especificamente, em seres humanos, no decorrer de 49 (seis a 115) meses através da aferição da proporção entre o enxerto e o osso neoformado em relação ao total de área mineralizada.

## MATERIAIS E MÉTODOS

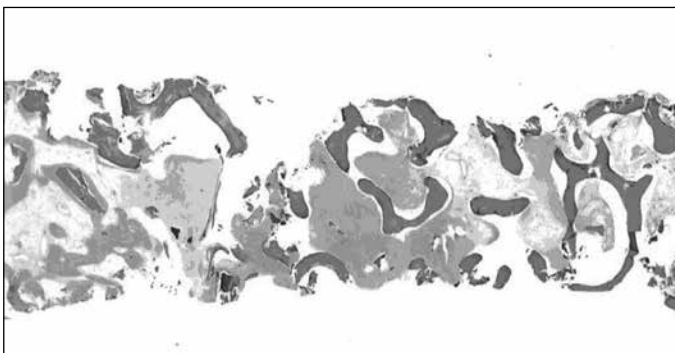
O desenho do estudo é uma série de casos que analisou os achados histológicos do ELB produzido conforme protocolo desenvolvido pelo autor principal<sup>(11-12)</sup>, em parceria com a empresa Baumer (Mogi Mirim – São Paulo – Brasil) e com o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), em modelos humanos. O protocolo, utilizado para produção deste, foi uma modificação baseada no de Kakiuchi *et al*<sup>(23)</sup> da Universidade de Osaka, Japão, publicado em 1996. Após as modificações, o ELB manteve praticamente inalterada a natureza química (composição proteico-mineral) e estrutural da matéria-prima, promovendo a obtenção de um produto adequado ao uso que se destina, portanto, com aplicabilidade em humanos<sup>(13)</sup>.

O grupo em estudo é formado por 12 pacientes, totalizando 13 amostras, coletado de julho de 2000 a janeiro de 2011 (média de 49 meses). O ELB foi utilizado isoladamente como enxerto nos casos que havia deficiências ósseas importantes – avaliadas subjetivamente pela equipe ortopédica – decorrente de patologia aguda ou crônica preexistente. O critério de inclusão foi necessidade de utilização de ELB em cirurgias primárias ou reintervenções a que porventura os pacientes tenham sido submetidos. A maioria desses apresentava boas condições clínicas e nenhuma patologia que contraindicasse quaisquer intervenções cirúrgicas; entretanto, cabe fazer alguns esclarecimentos: do paciente JARS, devido ao grande volume de ELB utilizado na primeira cirurgia, foi possível coletar duas biópsias de áreas distintas, sendo contado como dois casos; o paciente SG, apresentava sinais evidentes de infecção na primeira cirurgia, sendo a RATQ realizada no mesmo procedimento da enxertia.

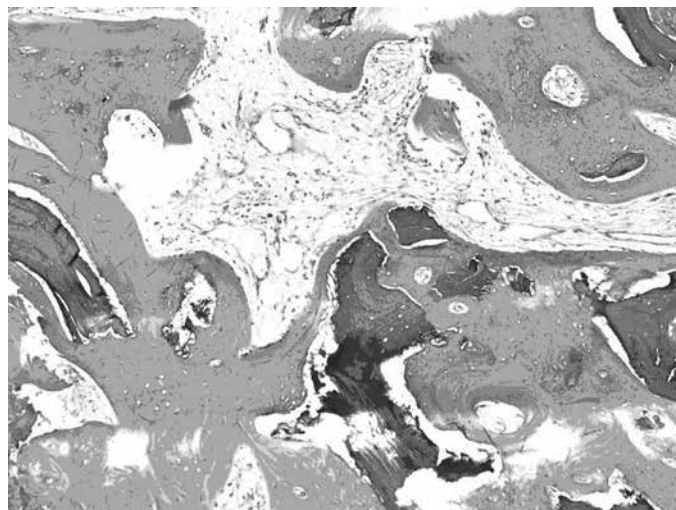
As biópsias foram coletadas no momento da reintervenção (por causa não relacionada à enxertia).

É importante frisar que de maneira alguma foi realizado qualquer procedimento com exclusivo objetivo de retiradas de fragmentos ósseos para análise do comportamento do enxerto. O tempo de seguimento foi estimado a partir da intervenção primária até o momento da biópsia. Sete dessas foram colhidas por agulha de Yamshidi, guiadas por intensificador de imagem, apresentando formato cilíndrico e medindo aproximadamente 6mm de comprimento por 2mm de diâmetro; as seis restantes, sob visão direta com o auxílio de saca-bocado ou cureta. Todas foram imediatamente imersas no fixador apropriado durante o ato cirúrgico e enviadas para posterior análise, conforme protocolo. No laboratório de patologia, as peças foram fixadas durante 12 a 16 horas em formalina tamponada a 10%, com volume 10 vezes superior ao da amostra. Sequencialmente, foram lavadas para retirar o excesso de fixador e transferidas para um descalcificador, que promove a retirada do fosfato de cálcio do tecido ósseo, utilizando ácido nítrico 10% (155ml de ácido nítrico a 65% e 845ml de água destilada) durante aproximadamente 24 horas. Após, foram lavadas com água destilada por seis horas para a retirada do ácido e submetidas à inclusão em parafina fundida a 60°C, formando blocos. Em seguida, as lâminas foram preparadas a partir de cortes seriados transversais de 200µm, em média, com lâmina de aço, sendo corados com solução de hematoxilina-eosina (HE). Durante esse processo, a HE evidencia o ELB levemente azulado, destoando das áreas com neoformação óssea que se mostram rosadas na microscopia (Figuras 1 e 2). Assim, após a digitalização das imagens, é possível visualizar claramente as áreas ocupadas por cada composto e mensurá-los.

Um médico do Serviço de Patologia – cegado em relação aos casos – foi responsável pela análise histológica das lâminas, discriminando – conforme critérios próprios – os seguintes achados: reabsorção do enxerto, presença de sinais inflamatórios e/ou infecciosos (presença de neutrófilos), neoformação óssea e



**Figura 1** – Enxerto liofilizado bovino (ELB) corado em azul com hematoxilina-eosina (HE). Aumento 10x. HCPA 2011.



**Figura 2** – Áreas azuladas correspondentes ao enxerto liofilizado bovino (ELB) corado com hematoxilina-eosina (HE). Aumento 100x. HCPA 2011.

fibröse. Após isso, um segundo grupo de pesquisadores, independentes e da mesma forma cegados em relação aos casos, digitalizou as lâminas e realizou a aferição das áreas mineralizadas ocupadas pelo ELB e pelo osso neoformado. As micrografias foram obtidas através de um microscópio (Axiolab E, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) que possui uma câmera (Sony Inc., Japão) de alta definição acoplada. As imagens foram inseridas em programa gráfico específico (ImageJ 1.40 – National Institutes of Health, EUA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para a exata quantificação de cada área. Os parâmetros histomorfométricos foram descritos na forma de *pixels* por um sistema de análise semiautomático, sendo esses dados repassados para o programa *Excel for Windows*, no qual foram definidas as proporções de cada componente dentro do total de área mineralizada.

A análise estatística foi realizada através do programa estatístico *SPSS 13 for Windows* (SPSS Inc. Chicago, IL, EUA). As análises descritivas são apresentadas na forma de média, valores máximo e mínimo, para variáveis quantitativas, e na de porcentagem, para as qualitativas.

A todos pacientes selecionados foram esclarecidos previamente os riscos, benefícios e propósito do procedimento cirúrgico e biópsias ósseas, assinando termo de consentimento informado concordando com todas as etapas. Este estudo foi realizado pelo Grupo de Quadril do Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Departamento de Cirurgia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), tendo colaboração do Serviço de Patologia da Instituição. A realização deste estudo foi aprovada pela comissão em ética e pesquisa do grupo de pós-graduação (GPPG) do HCPA.

## RESULTADOS

### Análise global

Todos os dados demográficos são descritos na Tabela 1. A média etária do grupo foi 51 anos (24 a 82), sendo composta de quatro (34%) indivíduos masculinos e oito (66%), femininos. A duração média de internação hospitalar foi de 10 (3-38) dias e o seguimento médio foi de 49 meses (6-115).

### Análise histológica

As lâminas apresentaram um padrão histológico homogêneo quando analisadas microscopicamente pelo patologista conforme critérios próprios (Tabela 2). Nenhuma delas apresentou resposta inflamatória exacerbada na periferia do ELB, o que afasta a hipótese de rejeição do organismo a corpo estranho. Neutrófilos foram detectados apenas na lâmina da paciente SG. Em todas as amostras, foi evidenciada presença de quantidade variável de fibrose (Figura 3), sinais de enxerto parcialmente reabsorvido (Figura 4) e de neoformação óssea evidentes (Figura 5). Nas lâminas analisadas há presença de tecido ósseo avital, que corresponde ao ELB, corado em azul, e de tecido vitalizado (com células nucleadas), representado osso neoformado. A integração entre o osso original, o ELB e as áreas de neoformação óssea são microscopicamente bem definidas e ocorrem em grandes blocos, mas mantendo um limite claro entre cada um (Figura 6).

### Análise específica

A digitalização das lâminas mostra uma proporção média de 42% (13 a 85%) de enxerto liofilizado bovino e 58% (15 a 87%) de neoformação óssea em relação ao total da área mineralizada (Tabela 3). É importante destacar que dois pacientes apresentaram diferenças importantes em relação às outras amostras com uma

relação proporção ELB/osso neoformado de 85/15% e 76/24%, sendo as lâminas revisadas, a fim de excluir quaisquer erros de medidas.

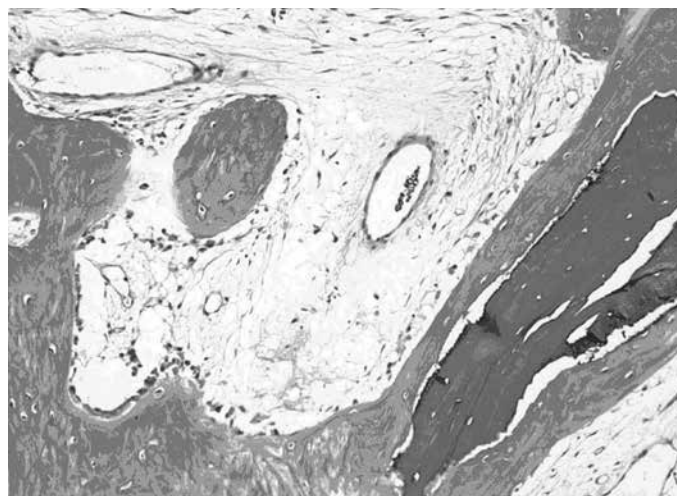
### Análise radiográfica

Os exames radiográficos de todos os pacientes mostram consolidação satisfatória no perímetro do enxerto.

**Tabela 2** - Análise histológica das lâminas.

	Neutrófilos	Fibrose	Absorção ELB	Neoformação óssea local
ALL	-	+	+	+
JARS 1	-	+	+	+
JARS 2	-	+	+	+
MTRC	-	+	-	+
EG	-	+	+	+
AMB	-	+	+	+
TGG	-	+	+	+
AACS	-	+	+	+
MB	-	+	+	+
SG	+	+	+	-
MH	-	+	+	+
HJCS	-	+	+	+
MAR	-	+	+	+

+: presente, -: ausente. HCPA 2011

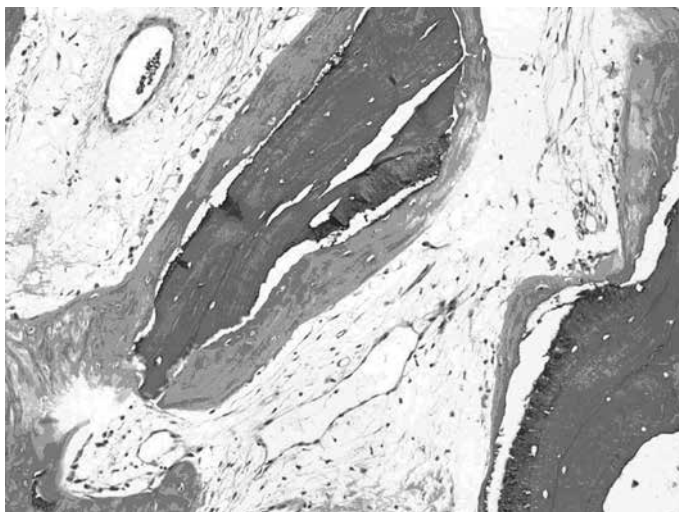


**Figura 3** – Fibrose representada pelas áreas claras esbranquiçadas no centro imagem. Aumento 200x. HCPA 2011.

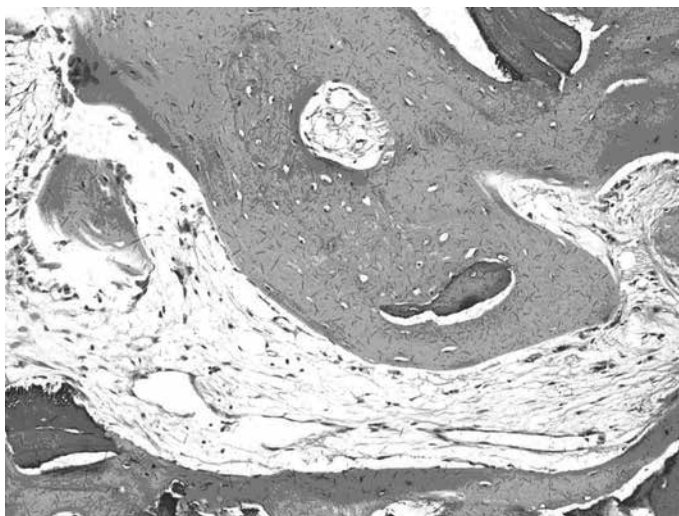
**Tabela 1** - Dados demográficos.

Paciente	Sexo	Idade (anos)	Procedimento	Diagnóstico	Internação (dias)	Evolução (meses)
1	1	24	OF	Pseudoartrose fêmur	9	6
2	1	25	ATC	Artrose talocalcaneana	3	59
3	2	82	RATQ	Desgaste material	10	9
4	2	51	RATQ	Desgaste material	9	72
5	2	64	RATQ	Desgaste material	10	43
6	2	30	OF	Cisto ósseo simples	14	68
7	2	79	RATQ	Desgaste material	38	19
8	2	55	ATQ	Coxartrose	7	82
9	2	60	RATQ	Desgaste material	12	50
10	1	45	OT	Desgaste material	3	35
11	1	43	OF	Pseudoartrose fêmur	11	16
12	1	48	RATQ	Desgaste material	7	115

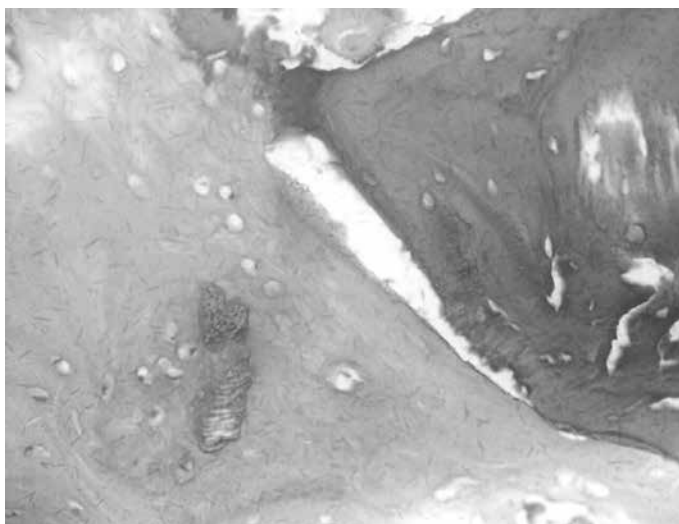
1 - Masculino, 2 - Feminino; OT: Osteossíntese de Tíbia, OF: Osteossíntese de Fêmur, ECO: Exérese de Calo Ósseo, ATC: Artrodese Talocalcaneana, ATQ: artroplastia total de quadril, RATQ: revisão de ATQ. HCPA 2011



**Figura 4** – Enxerto liofilizado bovino (ELB) (áreas azuis) cercado por tecido ósseo neoformado (áreas rosadas). Aumento 200x. HCPA 2011.



**Figura 5** – Enxerto liofilizado bovino (ELB) parcialmente reabsorvido (áreas azuis) cercado por tecido ósseo neoformado (áreas rosadas). Aumento 200x. HCPA 2011.



**Figura 6** – Limites bem definidos entre o enxerto liofilizado bovino (ELB) azulado e osso neoformado rosado. Aumento 400x. HCPA 2011.

**Tabela 3** - Proporções aferidas.

	ELB	Neoformação	Seguimento*
ALL	37%	63%	6
JARS 1	34%	66%	59
JARS 2	34%	66%	59
MTRC	23%	77%	9
EG	32%	68%	72
AMB	60%	40%	43
TGG	85%	15%	68
AACA	26%	74%	19
MB	13%	87%	82
SG	76%	24%	50
MH	47%	53%	62
HJCS	38%	62%	16
MAR	39%	61%	115

\* meses

## DISCUSSÃO

A possibilidade da utilização do enxerto liofilizado bovino (ELB), como alternativa ao autólogo em cirurgias ortopédicas, é investigado há tempo, principalmente em modelos animais<sup>(6)</sup>. O presente estudo contribui com informações adicionais extremamente relevantes em relação à utilização do ELB, produzido conforme protocolo desenvolvido pelo autor principal, em seres humanos, uma vez que demonstra sua osteointegração. Trabalhos prévios avalizam o uso desse ELB tanto em animais<sup>(15,16)</sup>, quanto em seres humanos<sup>(2,5,18)</sup>. Meyer *et al*<sup>(21)</sup> trouxeram os primeiros dados relativos à osteointegração histológica relacionados com ELB – Tutobone<sup>®</sup> – em seres humanos. Tais resultados mostraram-se promissores, motivando-nos a avaliar nossas biópsias e comparar os resultados obtidos com os disponíveis na literatura.

Em nosso estudo, que tem um desenho semelhante ao de Meyer *et al*<sup>(21)</sup>, encontramos nas lâminas analisadas uma proporção de 42% de preservação do ELB e 58% relacionado com áreas de neoformação óssea em relação ao total de área mineralizada no período médio de 49 meses. Esses dados são muito semelhantes aos apresentados por esse autor, que relata ter havido 47% de preservação do Tutobone<sup>®</sup> e 53% de neoformação óssea no decorrer de 11 meses em nove amostras.

A presença de ELB nas biópsias nos permite inferir que o enxerto proposto apresenta inegável osteocondutividade, sendo apenas parcialmente reabsorvido em seres humanos, diferentemente do completo remodelamento que ocorre em animais. Não achamos correlação linear entre o tempo de seguimento e as proporções de ELB/neoformação óssea em relação ao total de área mineralizada, não sendo possível definir um padrão exato de comportamento, já que na amostra com nove meses de seguimento tivemos uma taxa maior de osso neoformado do que na de 62 meses. Também relevante foi o fato de uma lâmina apresentar maior taxa de neoformação óssea (87%) ter sido uma das

de maior tempo de seguimento (82 meses). Com isso, é possível afirmar que o ELB utilizado promove osteointegração satisfatória, eficiente e duradoura com o tecido ósseo humano no período de seguimento aferido.

É interessante destacar que em duas amostras ocorreram diferenças importantes em relação às outras, as quais se confirmaram após nova análise: relação ELB/neoformação óssea de 85/15% e 76/24%, mostrando menor atividade osteoblástica perienxerto. Houve menor remodelamento ósseo nesses casos, sugerindo algum fator biológico ou mecânico limitante na reparação óssea. Um deles é portador da síndrome de Albright com grande comprometimento ósseo e metabólico, podendo ser este um fator relacionado com a menor neoformação óssea. É importante salientar que mesmo essas amostras não apresentaram diferença em relação à taxa de consolidação, nem piores desfechos clínicos.

Isso nos faz pensar que o tipo e a quantidade de enxerto aplicado não são os únicos responsáveis pela capacidade de neoformação óssea local, mas que cada organismo, com suas diferentes características biológicas, tem influência na resposta do processo de osteointegração. Elucidar isso não é o objetivo deste estudo, mas poderia justificar esse comportamento. A ausência de reação de corpo estranho em todas as lâminas demonstra biocompatibilidade do enxerto liofilizado bovino desenvolvido por nosso grupo neste estudo.

A presença de osteointegração satisfatória nos exames radiográficos mostra que o ELB deste estudo apresenta padrão visual semelhante a outros tipos de enxertia comumente utilizados. Experiências prévias apontaram completa integração óssea em 75,8% após seis meses e aproximadamente todos os casos em 12 meses<sup>(21)</sup>.

Não utilizamos grupo controle, uma vez que o delineamento do estudo não permite isso. O objetivo do estudo é avaliar o comportamento histológico do ELB em seres humanos e não discutir sobre sua superioridade.

## CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo histológico com enxerto liofilizado bovino (ELB), produzido conforme protocolo desenvolvido pelo autor principal, em seres humanos. Os resultados mostram que esse enxerto apresentou biocompatibilidade satisfatória e não causou dano aos pacientes. Além disso, mostrou boas osteocondução e integração no período médio de 49 meses de seguimento, cumprindo com a função que dele se espera.

Os resultados obtidos são promissores e contribuem para reforçar o papel desse ELB como opção terapêutica em cirurgias ortopédicas e odontológicas que necessitem de algum tipo de enxertia para preenchimento de deficiências ósseas.

## REFERÊNCIAS

- Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am.* 2002;84(3):454-64.
- Rosito R, Galia CR, Macedo CA, Moreira LF, Quaresma LM, Palma HM. Acetabular reconstruction with human and bovine freeze-dried bone grafts and a reinforcement device. *Clinics (Sao Paulo).* 2008;63(4):509-14.
- Lexer E. Joint transplantations and arthroplasty. Tradução de Frank H'Doubler. *Surg Gynecol Obstet.* 1925;40:782-809.
- Oliveira RC, Sicca CM, Silva TL, Cestari TM, Oliveira OT, Buzalaf MAR. Efeito da temperatura de desproteinização no preparo de osso cortical bovino microgranular. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular em subcutâneo de ratos. *Revista FOB.* 1999;7(3/4):85-93.
- Galia CR. Enxertos ósseos liofilizados impactados humanos e bovinos em revisão de artroplastia total de quadril [tese]. Porto Alegre/RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.
- Sugihara S, van Ginkel AD, Jiya TU, van Royen BJ, van Diest PJ, Wuisman PI. Histopathology of retrieved allografts of the femoral head. *J Bone Joint Surg Br.* 1999;81(2):336-41.
- Godwin L. Tissue banking and allograft transplantation. [periódico online]. 2000. Disponível em: [www.iscpubs.com/articles/abl/b0006god.pdf](http://www.iscpubs.com/articles/abl/b0006god.pdf)
- Buck BE, Malinin TI. Human bone and tissue allografts. Preparation and safety. *Clin Orthop Relat Res.* 1994;(303):8-17.
- Kreuz FP, Hyatt GW, Turner TC, Bassett AL. The preservation and clinical use of freeze-dried bone. *J Bone Joint Surg Am.* 1951;33(4):863-73.
- Autograft, allograft, and xenograft. Disponível em: [www.pharmacy.wisc.edu/courses/718-430/handouts/tisgraft.pdf](http://www.pharmacy.wisc.edu/courses/718-430/handouts/tisgraft.pdf)
- Seiler JG 3rd, Johnson J, Hand G, Microsurgery Clinic. Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *Journal of the Southern Orthopedic Association* Disponível em: [www.medscape.com/viewarticle/410431](http://www.medscape.com/viewarticle/410431).
- Lind M, Krarup N, Mikkelsen S, Horlyck E. Exchange impaction allografting for femoral revision hip arthroplasty: results in 87 cases after 3.6 years' follow-up. *J Arthroplasty.* 2002;17(2):158-64.
- Heliotis M, Tsiridis EE. Fresh frozen bone in femoral impaction grafting: can developments in bone regeneration improve on this? *Med Hypotheses.* 2001;57(6):675-8.
- Palmer SH, Gibbons CL, Athanasou NA. The pathology of bone allograft. *J Bone Joint Surg Br.* 1999; 81(2):333-5.
- Galia CR, Macedo CAS, Rosito R, Mello TM. Uso de enxerto ósseo homólogo e heterólogo em diáfise femoral de ratos: comparação entre enxerto ósseo congelado e liofilizado. *Rev Bras Ortop.* 2005;40:141-6
- Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Mello TM, Camargo LM, Moreira LF. In vitro and in vivo evaluation of lyophilized bovine bone biocompatibility. *Clinics (Sao Paulo).* 2008; 63(6):801-6.
- Williams D. Revisiting the definition of biocompatibility. *Med Device Technol.* 2003;14(8):10-3.
- Nuss KM, Auer JA, Boos A, von Rechenberg B. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bones. *BMC Musculoskelet Disord.* 2006;7:67.
- Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater.* 2007;13:1-10.
- Conn RA, Peterson LFA, Stauffer RN, Ilstrup D. Management of acetabular deficiency: Long-term results of bone grafting the acetabulum in total hip arthroplasty. *Orthopaedics Trans.* 1985;9:451-4
- Meyer S, Floerkemeier T, Windhagen H. Histological osseointegration of Tubobone: first results in human. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2008;128(6):539-44.
- Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Mello TM, Camargo LM, Moreira LF. Femoral and acetabular revision using impacted nondemineralized freeze-dried bone allograft. *J Orthop Sci.* 2009;14(3):259-65.
- Kakiuchi M, Ono K, Nishimura A, Shiokawa H. Preparation of bank bone using defatting, freeze-drying and sterilisation with ethylene oxide gas. Part 1. Experimental evaluation of its efficacy and safety. *Int Orthop.* 1996;20(3):142-6.