

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
CIRÚRGICAS**

**ANÁLISE HISTOLÓGICA DA NEOFORMAÇÃO
ÓSSEA COM O USO DE ENXERTO BOVINO
LIOFILIZADO**

TESE DE DOUTORADO

Tiango Aguiar Ribeiro

**PORTO ALEGRE
2015**

ANÁLISE HISTOLÓGICA DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA COM O USO DE ENXERTO BOVINO LIOFILIZADO

Tiango Aguiar Ribeiro

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas,
Área de Concentração Reconstrução Óssea, da Universidade Federal do
Rio Grande do Sul (UFRGS, RS), como requisito parcial para obtenção do
grau de **Doutor em Ciências Cirúrgicas**.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Galia

**Porto Alegre, RS, Brasil
2015**

CIP - Catalogação na Publicação

Aguiar Ribeiro, Tiango

Análise Histológica da Neoformação Óssea com o Uso de Enxerto Bovino Liofilizado / Tiango Aguiar Ribeiro. -- 2015.

121 f.

Orientador: Carlos Roberto Galia.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Liofilização. 2. Xenoenxerto. 3. Biópsia. 4. Artroplastia Total de Quadril. 5. Artroplastia Total de Revisão de Quadril. I. Roberto Galia, Carlos, orient. II. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
CIRÚRGICAS**

**A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Tese de Doutorado**

**ANÁLISE HISTÓLICA DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA COM O USO
DE ENXERTO BOVINO LIOFILIZADO**

elaborada por
Tiango Aguiar Ribeiro

como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor em Ciências Cirúrgicas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Carlos Roberto Galia, Dr.
(Presidente/Orientador)

Carlos Alberto de Souza Macedo, Dr. (UFRGS)

Carlos Otávio Corso, Dr. (UFRGS)

Carlos Roberto Schwartzmann, Dr. (UFCSPA)

Melissa Orlandin Premaor, Dra. (UFSM)

Porto Alegre, 13 de Janeiro de 2015.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, em primeiro lugar, a minha família que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos de dificuldade e alegria; em especial para a minha mãe Dirce Teixeira Aguiar, uma batalhadora e com muita honra professora alfabetizadora, e aos meus irmãos Deryck Aguiar Ribeiro, Henry Aguiar Ribeiro e Melysse Aguiar Ribeiro.

Dedico, *in memoriam*, este trabalho ao meu pai, Sebastião Tadeu de Campos Ribeiro, que, assim como minha mãe, sempre batalhou para que eu pudesse estudar e chegar até este presente momento. Sei que, de onde ele estiver, estará feliz e orgulhoso deste seu filho.

Dedico também a Diego Rodrigo Zanella Martinez Caro que sempre soube ser compreensivo e um grande ombro amigo nos momentos em que achei que não conseguiria realizar este Doutorado em tempo hábil.

Gostaria de dedicar esta dissertação a um grande mestre que me ensinou a arte da cirurgia do quadril, a arte da reconstrução, um mestre que me fez ter gosto pelos desafios e instigou a minha constante busca por respostas aos temas científicos e acadêmicos. Agradeço de coração a esta pessoa extremamente simples, calma e, sobretudo humildade. Agradeço a todas as oportunidades e ensinamentos que este grande Professor me proporcionou e transmitiu. Ao Professor e sempre amigo Carlos Roberto Galia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos os pacientes que cooperaram para que este trabalho tivesse êxito, pela paciência, prontidão e gentileza ao responderem os questionários e permitirem serem examinados.

Agradeço a colaboração e sempre boa vontade dos Médicos Residentes do Serviço de Ortopedia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, os quais sempre estiveram de prontidão quando os requeri ajuda.

Agradeço a todos os funcionários do Serviço de Ortopedia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pela cordialidade em me receber durante meu tempo de estágio.

Agradeço a sempre presente amizade da Caroline Coussirat, do Fernando Pagnussato e do Leandro de Freitas Spinelli, grandes amigos e parceiros de grupo de pesquisa durante esta longa jornada.

Por final gostaria de agradecer a cordialidade, a simplicidade e as palavras amigas, assim como a forma fraternal do Prof. Carlos Alberto de Souza Macedo ao me receber neste período de aprendizado no Serviço de Ortopedia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Assim como ter contribuído com seus conhecimentos e sua experiência para o meu aprendizado em ortopedia e traumatologia, obrigado pelos ensinamentos transmitidos.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	6
LISTA DE TABELAS	7
LISTA DE SIGLAS	8
LISTA DE ANEXOS	9
LISTA DE APÊNDICES	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Justificativa	14
2 HIPÓTESE	15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
3.1 Artroplastia de quadril.....	19
3.2 Artroplastia total de quadril de revisão (ATQR).....	21
3.3 Enxertos ósseos	22
3.4 Biópsia óssea.....	24
4 OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo geral.....	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
5 MÉTODOS	27
5.1 Delineamento.....	27
5.2 Amostra	27
5.3 Período de coleta de dados	27
5.4 População-alvo	28
5.4.1 Critérios de inclusão.....	28
5.4.2 Critério de exclusão.....	28
5.5 Variáveis coletadas	29
5.4.1 Variáveis coletadas no prontuário e com o paciente.....	29
5.4.2 Variáveis coletadas nas lâminas	29
5.6 Coleta de material, preparação das lâminas e análise histológica	30
5.7 Registro e processamento dos dados	31
5.8 Estruturação do banco de dados e análise estatística.....	31
5.9 Aspectos éticos.....	32
6 ARTIGO ORIGINAL	33
6.1 Artigo em português	33
6.2Artigo em inglês	52
REFERÊNCIAS	71
CONCLUSÃO	90
ANEXOS	91
APÊNDICES	99

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO

Figura I – Lâmina histológica.....	42
Figura II – Distribuição xenoenxerto bovino vs presença de neoformação óssea.....	42

ARTICLE

Figure I – Biopsy slide	61
Figure II – Distribution plot of remnant xenograft vs the presence of neoformed bone....	61

APÊNDICES

Gráfico 1 – Histograma da idade.....	100
Gráfico 2 – Histograma da proporção de EBL remanescente.....	101
Gráfico 3 – Histograma da proporção de neoformação óssea.....	101
Gráfico 4 – Histograma do tempo de internação.....	102
Gráfico 5 – Histograma do tempo de reintervenção.....	102
Gráfico 6 – Gráfico de caixas da distribuição de idade entre os gêneros.....	103
Gráfico 7 – Gráfico de caixas da proporção de EBL remanescente entre os gêneros.....	104
Gráfico 8 – Gráfico de caixas da proporção de neoformação óssea entre os gêneros.....	105
Gráfico 9 – Gráfico de caixas do tempo de internação entre os gêneros.....	106
Gráfico 10 – Gráfico de caixas do tempo de reintervenção entre os gêneros	107
Gráfico 11 – Gráfico de dispersão entre a neoformação óssea e EBL remanescente	108
Gráfico 12 – Diagrama de dispersão entre a neoformação óssea e o tempo de reintervenção	109
Gráfico 13 – Diagrama de dispersão entre a neoformação óssea e o tempo de reintervenção de acordo com o gênero.....	110
Gráfico 14 – Diagrama de dispersão entre a proporção de EBL remanescente e o tempo de reintervenção	111
Gráfico 15 – Diagrama de dispersão entre a proporção de EBL remanescente e o tempo de reintervenção de acordo com o gênero.....	112
Lâmina 1 – Lâmina histológica	113
Lâmina 2 – Lâmina histológica.	114
Lâmina 3 – Lâmina histológica	114

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

Tabela 1 – Características..... 41

ARTICLE

Table 1 –Characteristics 60

LISTA DE SIGLAS

AINEs	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
ATQ	Artroplastia Total de Quadril
ATQR	Artroplastia Total de Quadril de Revisão
BLX	<i>Bovine Lyophilized Xenograft</i>
BSE	<i>Bovine spongiform encephalopathy disease</i>
CI	<i>Confidence Interval</i>
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CJD	<i>Creutzfeldt-Jakob disease</i>
DCJ	Doença de Creutzfeldt-Jakob
DP	Desvio Padrão
EBL	Enxerto Bovino Liofilizado
EEB	Encefalopatia espongiiforme bovina
GPPG	Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC	Intervalo de Confiança
IQ	Interquartil
IQR	<i>Interquartile Range</i>
IRB	<i>Institutional Review Board</i>
MS	Ministério da Saúde
OA	Osteoartrose ou osteoartrite
OHRP	<i>Office for Human Research Protections</i>
Ph.D.	<i>Philosophiae Doctor</i>
RS	Rio Grande do Sul
SD	<i>Standard Deviation</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TC	Termo de Confidencialidade
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
THARS	<i>Total Hip Arthroplasty Revision Surgery</i>
UFCSA	Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Formulário de preenchimento	92
Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	95
Anexo C – Termo de Confidencialidade (TC).....	98

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Gráficos.....	100
Apêndice B – Lâminas.....	113
Apêndice C – Publicação.....	115

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

ANÁLISE HISTOLÓGICA DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA COM O USO DE ENXERTO BOVINO LIOFILIZADO

AUTOR: TIANGO AGUIAR RIBEIRO
ORIENTADOR: CARLOS ROBERTO GALIA
Porto Alegre, 13 de Janeiro 2015.

A artroplastia é, em última análise, a opção final para o tratamento da osteoartrose. Com o aumento do número de indicações deste procedimento, a troca (artroplastia total de quadril de revisão – ATQR) dos componentes também passou a ser mais frequente. Os defeitos ósseos ou falhas ósseas são problemas que podem ser encontrados quando se realiza uma ATQR e, eles devem ser reparados, ou seja, o quadril do paciente a receber outra prótese necessita ser reconstruído. Para isto a grande maioria das técnicas empregadas requer o uso de enxerto ósseo e, devido a este motivo este tecido tem se tornado um dos tecidos mais transplantados na atualidade. Porém a demanda para utilização dos enxertos, na maioria provenientes de bancos de tecidos ósseos, tem aumentado, mas o suprimento é insuficiente. Portanto faz-se necessário a busca por novas tecnologias e alternativas aos bancos de tecidos. O enxerto bovino liofilizado (EBL) é uma destas opções, sua produção em livre demanda suas características físicas e químicas semelhantes ao osso humano e sua boa repercussão clínico-radiológica o torna uma alternativa viável. Este estudo tem o objetivo de verificar e quantificar a neoformação óssea com o uso do EBL pelo uso da avaliação histológica. Realizou-se um estudo de casos de Julho de 2000 a Abril de 2013 no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), onde se incluíram sujeitos que foram submetidos a uma cirurgia prévia cirurgia de ATQR onde foi utilizado o EBL os quais internaram posteriormente para uma segunda cirurgia de ATQR não relacionada a falha do enxerto e sim a falha da prótese. Nesta segunda cirurgia realizou-se a biópsia óssea. Quatorze sujeitos foram analisados, sendo 64,3% do sexo feminino. A média de idade dos pacientes foi $52,36 \pm 18,55$. Neoformação óssea estava presente em 85,7% dos sujeitos, e constituiu 61,79% da área total de matriz óssea. O diagnóstico de absorção do EBL estava presente em 12 sujeitos. Uma forte correlação de proporção inversa foi constatada pelo teste de Pearson entre a porcentagem de osso neoformado e a porcentagem de EBL na área total de matriz óssea ($p=0,001$). Nenhuma resposta inflamatória foi encontrada. Concluiu-se que houve neoformação óssea adequada na grande maioria dos casos sendo o EBL uma boa estrutura osteocondutora, podendo ser considerado uma alternativa aos outros enxertos ósseos no tratamento das falhas ósseas.

Palavras-chave: Liofilização, Xenoenxerto, Biópsia, Transplante, Heterólogo, Liofilizado, Osso Bovino, Artroplastia Total de Quadril, Artroplastia de Revisão

ABSTRACT

Ph.D. Thesis
Postgraduate Program in Surgical Sciences
Federal University of Rio Grande do Sul

HISTOLOGICAL ANALYSIS OF BONE NEOFORMATION WITH THE USE OF LYOPHILIZED BOVINE XENOGRAFT

AUTHOR: TIANGO AGUIAR RIBEIRO
SUPERVISOR: CARLOS ROBERTO GALIA
Porto Alegre, January 13, 2015.

Arthroplasty is, ultimately, the final option for the treatment of osteoarthritis. With the increasing number of indications of this procedure, the exchange (total hip arthroplasty revision surgery- THARS) also became more frequent. The bone defects are problems that can be encountered when conducting a THARS and this defect must be repaired, in other words, the patient's hip needs to be rebuilt before receive a new prosthesis. Most of techniques used to rebuild requires the use of bone graft, and because of this reason, this tissue has become one of the most transplanted tissues today. However the demand for the use of grafts, mostly from bone tissue banks, has increased, but the supply is insufficient. Therefore it is necessary to search for new technologies and alternatives to tissue banks. The bovine lyophilized xenograft (BLX) is one of these options; the production on free demand, its physical and chemical characteristics similar to human bone and its good clinical and radiological outcomes makes it a viable alternative. The aim of this study was to verify and quantify new bone formation by the histological analysis in subjects who received the BLX. This was a case series from July 2000 to April 2013 realized in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. This study included patients who underwent to a THARS where was used the BLX, which later was admitted to a second THARS surgery, not related to the xenograft failure but a mechanical failure of the implant. In this second surgery was performed the bone biopsy. Fourteen subjects were analyzed, 64.3% were female. The average age of patients was 52.36 ± 18.55 years. New bone formation was present in 85.7% of subjects, and constituted 61.79% of the total bone matrix. The diagnosis of BLX absorption was present in 12 subjects. A strong inverse correlation founded by the Pearson's test was observed between the proportion of new bone and the proportion of BLX ($p=0.001$). No inflammatory response was found. Was concluded that there was suitable bone formation in the vast majority of the cases, as well as the BLX is a good osteoconductive scaffold and can be considered an alternative to other bone graft in the treatment of bone defects.

Keywords: Freeze Drying; Xenograft; Biopsy; Transplantation, Heterologous, Lyophilized, Bovine Bone, Total Hip Arthroplasty, Revision Arthroplasty

1 INTRODUÇÃO

A osteoartrose ou osteoartrite (OA) é uma patologia crônico-degenerativa que afeta as articulações sinoviais, em especial o quadril (1-4). Considera-se que tenha etiologia multifatorial sofrendo, portanto, a influência de diversos fatores (5). Na maior parte das vezes está relacionada com alterações de carga sobre a articulação somada a microtraumas frequentes ou a alteração de carga somada a um único evento de grande porte, um macrotrauma(6, 7). O tratamento desta patologia deve iniciar da forma menos agressiva, com uma abordagem não cirúrgica constituída de medidas não farmacológicas e medidas farmacológicas (8, 9). Porém quando ocorre a falha desta abordagem, ou quando o dano degenerativo é severo, o procedimento cirúrgico de substituição da articulação lesionada por um componente protético é indicado. Este procedimento denominado de artroplastia do quadril tem a função de aliviar a dor, melhorar a função motora e reabilitar o paciente (9).

A artroplastia de quadril é considerada um dos maiores êxitos da ortopedia moderna (10, 11). Não é esse um procedimento isento de complicações,ou seja, com o aumento do número de cirurgias de artroplastia realizados, a troca dos componentes também passou a ser mais freqüente (12). A artroplastia total de quadril de revisão (ATQR), como é chamada a troca de uma prótese por outra, tem como motivo principal o desgaste dos componentes protéticos, mas a soltura asséptica (sem infecção) também é outro frequente motivo para a realização desta cirurgia. Contudo outros podem ser os motivos a indicar uma cirurgia de ATQR, como a fratura femoral, a falha de um dos componentes, a infecção e a luxação redicivante da prótese (13).

O defeito ósseo ou falha óssea é um dos grandes problemas que pode ser encontrado no momento em que se realiza uma ATQR, este defeito pode ser no fêmur e/ou no acetábulo.

Quando diagnosticado um defeito ósseo, este deve ser reparado, ou seja, o quadril do paciente a receber outra prótese necessita ser reconstruído (14-17). Muitas técnicas estão descritas na literatura, porém uma grande maioria necessita da utilização de enxerto ósseo (18-20). Portanto o tecido ósseo tem se tornado um dos tecidos mais transplantados na atualidade (21-23).

1.1 Justificativa

A demanda pela utilização de enxertos em cirurgias de ATQR tem aumentado (24) e o suprimento tem sido insuficiente (25), muito devido à atual conjuntura do país, ao alto custo financeiro e a dificuldade para se criar e manter um banco de tecidos (26); então a busca por novas tecnologias e alternativas aos bancos de tecidos devem ser encorajadas.

O enxerto bovino liofilizado (EBL) é uma destas opções, sua produção em livre demanda (26), suas características físicas e químicas semelhantes ao osso humano (27, 28) e sua boa repercussão clínica-radiológica o tornam uma alternativa viável (28-30).

A biópsia associada à análise histológica continua sendo a única forma fidedigna de demonstrar e avaliar a real efetividade dos diferentes tipos de enxerto em osteointegrar e auxiliarem na neoformação óssea (31). Portanto este estudo é de grande importância, pois se propõe a ser o segundo estudo na literatura mundial a analisar histologicamente biópsias de tecido ósseo onde foi utilizado o EBL.

2 HIPÓTESE

O presente trabalho apresenta a hipótese conceitual e os seguintes objetivos abaixo:

H0 - Não se obteve neoformação óssea com o uso do enxerto bovino liofilizado (EBL) nas amostras analisadas histologicamente, portanto não é um xenoenxerto com resultados adequados para uso em humanos.

H1 - Obteve-se neoformação óssea com o uso do EBL nas amostras analisadas histologicamente, portanto é um xenoenxerto com resultados adequados para uso em humanos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O envelhecimento representa um processo natural e fisiológico, cujas experiências emocionais, psicológicas e ambientais, o tornam singular e individual (32). O indivíduo idoso apresenta alguns aspectos próprios como: tendência a ter múltiplas doenças, muita delas crônicas e, uma recuperação lenta. Sendo assim, as alterações fisiológicas, ao se somarem, diminuem a capacidade funcional do indivíduo e, conseqüentemente, comprometem sua qualidade de vida. No Brasil, o número total de idosos passou de 5,9% em 2000 para 7,4% em 2010 e o índice de envelhecimento por ano, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) (2), que era de 28,9 em 2000, passou para 39,5 em 2010.

A OA é uma destas doenças crônicas que afetam a população idosa (33). É a patologia crônico-degenerativa que afeta as articulações sinoviais, e é considerada a doença crônica que mais acomete o sistema locomotor (1-4). É prevalente em pessoas de meia idade e idosos (34), assim como é extremamente presente nos grandes idosos (considerados aqueles com idade igual ou superior a 70 anos) (35). Sabe-se que sua incidência aumenta com o envelhecimento (36), porém acredita-se que a artrose na articulação do quadril, ou coxartrose, acometa 3% dos indivíduos adultos com idade maior que 30anosos quais apresentem dor no quadril (37, 38).

A OA pode ser classificada em dois tipos principais, aquela que não tem fator causal conhecido, ou seja, sem causa aparente – artrose primária – e aquela que tem um fator causal conhecido – artrose secundária – (39). Atualmente considera-se que a coxartrose é uma patologia multifatorial, ou seja, que sofre a influência ou que tem como causa diversos fatores(5). Na grande maioria dos pacientes ela esta relacionada com as alterações proporcionadas pela carga (força física) oriunda de microtraumas repetitivos ou de um único

evento, um macrotrauma (6, 7). Porém também pode estar relacionada em menor intensidade a alterações e modificações nos genes e a impregnação de pigmentos sobre a cartilagem (Ocronose) (40). Considera-se, então, a OA como um resultado de fatores sistêmicos e locais, sendo que muitos destes fatores ainda não foram totalmente explicitados pelos estudos (41), porém outros já são conhecidos.

O componente genético, dentre os fatores conhecidos (42), foi primeiramente descrito por Kelgren *et al.* (43). Acredita-se que sua influência possa representar em torno de 50 a 65% (44), porém não se sabe a real inferência da genética como etiologia para a osteoartrose, esta inferência pode inclusive estar associada a alterações individuais do código genético (42, 45). A obesidade também é outro fator de risco para o desenvolvimento desta patologia crônico-degenerativa na articulação do quadril (42). Cooper *et al.* (46) relatam que indivíduos com índice de massa corporal acima de 28 tem uma chance 1,7 vezes maior de desenvolver coxartrose.

Do mesmo modo, a associação entre idade e OA é bastante forte (6), podendo a idade ser considerada como o fator de risco mais fortemente relacionado com a OA (42). Acredita-se que com o processo de envelhecimento os condrócitos diminuam seu número na articulação, como demonstrou um estudo em que foram analisadas articulações do quadril de recém mortos e articulações do quadril de doadores sadios sem alterações degenerativas prévias (47). Outros estudos mostram que os condrócitos também diminuem sua capacidade proliferativa e sua capacidade sintética com o processo do envelhecimento (48), assim como a idade pode predispor estas células a um maior grau de apoptose (49, 50).

A OA também pode ter como fator de risco o gênero, estudos trazem novas concepções ao sugerir que a influência da falta de estrógeno na mulher pode levar a predisposição para a artrose (51, 52). Estudos em humanos (53) e animais (54) mostram que a terapia de reposição hormonal diminui a incidência de artrose, porém estas afirmações ainda

são inconclusivas, pois nenhum estudo prospectivo randomizado foi realizado para provar em definitivo tal influência hormonal (6, 42). Portanto esta relação estrógeno vs OA ainda é fracamente entendida (55).

Outro fator de risco é o mau alinhamento articular (42). A alteração da morfologia normal da articulação também é considerada fator de risco, alterando a distribuição de cargas a alteração morfológica pode interferir na nutrição da cartilagem o que pode resultar na alteração bioquímica desta superfície e sua evolução para um quadro degenerativo (56).

A OA no quadril caracteriza-se pela lesão à cartilagem hialina (9), formação de osteófitos, cistos, esclerose subcondral, levando o portador desta afecção crônico-degenerativa a episódios frequentes de dor, dificuldade para caminhar e a progressiva perda da amplitude de movimento da articulação (1, 3, 4). O tratamento para a OA do quadril basicamente consiste em melhorar a função da articulação e controlar a dor (57). Inicialmente preconiza-se por uma abordagem menos agressiva, ou também descrita como abordagem não cirúrgica, constituída de duas modalidades, a não farmacológica e a farmacológica (8, 9).

A abordagem não farmacológica da coxartrose é apoiada em diversos pontos: orientação aos pacientes, exercícios físicos, perda de peso e fisioterapia (9, 58). O tratamento farmacológico para a coxartrose deve, de preferência, ser associado à abordagem não farmacológica (9). O objetivo deste tratamento é o alívio dos sintomas álgicos da articulação afetada. O uso de simples analgésicos, quando consideramos uma dor leve, ou o uso de anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) para dores moderadas e de forte intensidade devem ser ponderados (59). O uso de condroprotetores como protetores da cartilagem, por sua ação na redução da lesão da cartilagem articular, como o Sulfato de Glicosamina e Sulfato de Condroitina tem sido amplamente difundido (9), porém estas drogas não possuem efetividade contra o alívio da dor e também não possuem efetividade na melhora da funcionalidade (60).

Segundo a literatura, não existe cura para a coxartrose e em casos de baixa resposta ou falha do tratamento menos agressivo (não farmacológico e farmacológico) (61), deve-se optar pelos procedimentos cirúrgicos. Têm-se como opções cirúrgicas para o tratamento da OA: as cirurgias de osteotomia (62), a artroscopia que deve ser considerada em alguns poucos casos quando do diagnóstico artrose em estágio inicial (63-71), e por final a cirurgia de artroplastia de quadril.

O procedimento cirúrgico de substituição de uma articulação por um componente protético é em última análise a etapa final do tratamento para artrose, ou seja, quando ocorreu falha dos demais tratamentos ou quando a artrose do quadril é demasiada severa. Este procedimento é conhecido como cirurgia de artroplastia do quadril e tem a função crucial de trazer o alívio da dor, assim como melhorar a função motora, tentar reabilitar o paciente para o retorno ao trabalho e aprimorar a marcha do paciente operado (9).

3.1 Artroplastia de quadril

A artroplastia de quadril é considerada um dos maiores êxitos da ortopedia moderna (10, 11). A indicação primária para realização de uma artroplastia de quadril continua sendo a artrose (9). A reabilitação e o retorno do paciente para uma vida quase ou muitas vezes normal tornam este procedimento um dos poucos procedimentos médicos com grande benefício ao paciente e à sociedade como um todo (72).

A artroplastia de quadril teve seu início em Berlim na Alemanha, no final do século XIX com Themistocles Gluck, o qual confeccionou cabeças em marfim como substituição a cabeça femoral, surgindo então o conceito de prótese parcial ou hemiartroplastia. Gluck fez os

primeiros experimentos desta técnica em humanos com quadril tuberculoso e demonstrou que o organismo humano é tolerante a corpos estranhos (73, 74). Porém foi John Charnley (75) o ortopedista que definitivamente mudou e consolidou o conceito de artroplastia total de quadril. Seus conceitos de artroplastia de baixa fricção (baixo atrito) (76) proporcionado pela diminuição da área de atrito devido à redução do diâmetro da cabeça femoral para 22mm e o uso do polietileno de alto peso molecular associado ao uso do metilmetacrilato (cimento) (77) desenvolvido por Leon Wiltsie, em Los Angeles EUA, foram os conceitos que mudaram os rumos da história da cirurgia de ATQ.

Porém o procedimento cirúrgico de ATQ não é um procedimento isento de complicações, pode-se relatar como tais adventos: as luxações (ocorrendo entre 0,3% a 3% nas ATQ primárias e podendo chegar a índices de até 10% nas ATQR), a lesão neurológica dos nervos ciático e/ou obturador que são as mais comuns (em 3,5% dos casos), a lesão vascular considerada rara (podendo ocorrer em 0,2% a 0,5% dos pacientes), a infecção (variando entre 1% a 2% nas ATQ primárias e de 3% a 4% nas ATQR), o tromboembolismo (ocorrendo em 1% dos pacientes), as fraturas do fêmur e/ou do acetábulo no transoperatório, soltura asséptica dos componentes protéticos (varia de acordo com o tipo de componente utilizado e o tempo da artroplastia), o *Stress Shielding*, a discrepância dos membros inferiores e a metalose relacionada ao desgaste do polietileno e relacionada à osteólise (39, 78).

3.2 Artroplastia total de quadril de revisão (ATQR)

Com o aumento da longevidade da população e a indicação cada vez maior do procedimento de artroplastia total de quadril em pacientes mais jovens a necessidade da troca deste implante aumentou (12), ou seja, aumentou a necessidade de realização da cirurgia de ATQR. A outra indicação, e considerada a mais comum para este procedimento de troca é a falha da ATQ primária por soltura asséptica (sem infecção). Porém outras causas também podem indicar a ATQR, como a fratura femoral, a falha de um dos componentes, a infecção e a luxação recorrente (recidivante) da prótese (13).

Quando se realiza uma cirurgia de ATQR pode-se encontrar a presença de um estoque ósseo pequeno quando comparado ao estoque ósseo presente na cirurgia de ATQ primária, ou seja, pode-se encontrar um defeito ósseo que necessita ser reparado, um quadril que necessita ser reconstruído. Este defeito pode ser no fêmur e/ou no acetábulo (14-17). Diversas classificações foram desenvolvidas para melhor entender e tentar definir um padrão de técnica de reconstrução para cada defeito ósseo, mas nenhuma é totalmente aceita (79, 80).

Diversas opções de tratamento relatadas na literatura podem ser empregadas para reconstrução dos defeitos ósseos femorais, entre elas: o uso de componentes femorais não cimentados de superfície rugosa, hastes cimentadas longas, as endopróteses, as hastes de fixação distal não cimentadas (Wagner), assim como a utilização de enxertos estruturados e a utilização de enxerto ósseo picado impactado (18-20, 81-87).

Para os defeitos ósseos acetabulares também se pode optar por diversas técnicas descritas na literatura: como o uso de enxerto alográfico estruturado (12, 88, 89), substituição do acetábulo por um acetábulo alográfico inteiro (enxerto alográfico) (12), uso de enxerto

ósseo impactado e associado à cimentação de um novo acetábulo de polietileno (90), uso de telas antiprotusão e anéis de reforço acetabular associados ao uso de enxerto (91), uso de acetábulos grandes não cimentados (*jumbo cups*) associados ou não ao uso de enxerto (92), o uso de cunhas de metal trabecular (tântalo) associado a acetábulo não cimentado de metal trabecular (93-96), uso de cunhas de metal trabecular associado a enxerto impactado e à cimentação de um novo acetábulo de polietileno (97).

Observa-se que a grande maioria das técnicas utilizadas para correção dos defeitos ósseos tanto acetabulares quanto femorais necessitam do uso de enxertos ósseos.

3.3 Enxertos ósseos

O tecido ósseo tem se tornado um dos tecidos mais transplantados na atualidade (21-23), e este fato tem se tornado bastante frequente e comum (98). Este tecido tem sido requerido para o tratamento de diversas patologias(99)onde exista a presença de falha óssea ou defeito ósseo (100). Entre os procedimentos mais comuns estão às cirurgias para o tratamento dos tumores ósseos e as cirurgias para reconstrução das falhas ósseas presentes nas revisões de prótese de joelho e quadril (20, 101). Nas cirurgias de ATQR a reconstrução de um defeito ósseo acetabular é considerada um dos pontos cruciais para a obtenção de um bom resultado (102). O tratamento desta falha óssea pode ser feito pelo uso de enxertos (103). Não se sabe ao certo quando os estudos sobre os transplantes de ossos (uso de enxertos) começaram a ser feitos, mas sabe-se que os primeiros relatos de transplante datam do início da era cristã (99). A primeira notícia de sucesso sobre um transplante ósseo foi de Sir William MacEwan que transplantou a tíbia de uma criança para o braço de outra. E o primeiro relato

de um transplante realizado entre espécies, o qual teve sucesso, foi realizado na Alemanha por Job van Meekren em 1668, onde foi transplantado fragmentos ósseos de um cão para um paciente humano com um defeito ósseo (99, 104).

Ao ser realizado um transplante de tecido ósseo busca-se o reparo de um defeito ósseo, de uma lesão óssea, então se espera que o tecido transplantado osteointegre-se ao tecido hospedeiro (99). Para que tal fato ocorra, a escolha do enxerto é de vital importância, e esta escolha deve levar em conta as propriedades destes materiais, as quais são três: osteocondução, osteoindução e osteogênese. Osteocondução: é a propriedade que os enxertos possuem de servir como um suporte, uma estrutura ou matriz para que o novo osso cresça. Osteoindução: é a propriedade que alguns enxertos têm de possuírem fatores indutores, proteínas, que irão formar células osteoprogenitoras que irão induzir a formação de osso novo. Osteogênese: propriedade que alguns enxertos têm de possuírem células osteogênicas (osteoblastos ou precursores de osteoblastos) as quais irão induzir a regeneração óssea (25, 103).

Os enxertos autólogos ou autógenos são oriundos do próprio paciente que vai receber o transplante. Estes tecidos possuem as três propriedades (osteoindução, osteocondução e osteogênese) e por este motivo são considerados como ideais, o padrão ouro, para realização de transplantes ósseos (25, 100, 103). Estes enxertos não têm o risco de transmitirem doenças ou de induzirem a reação imunológica (103), porém quantidade ofertada é pequena e no local da sua retirada podem ocorrer complicações (infecção, dor local, sangramento no local e hematoma) (25, 100, 103, 105-107).

Os enxertos homólogos ou alográficos são também uma alternativa, são enxertos de uma mesma espécie (108), trazem o risco de transmissão de doenças e tumores (20, 24, 98, 109, 110), assim como de reação imunológica (103, 108, 111, 112). O uso de enxertos alográficos está limitado à presença de banco de tecido nas instituições, ou que as instituições

sejam credenciadas a outra instituição que possua banco de tecidos. Na atual conjuntura do país, alto custo e dificuldade para se criar e manter um banco de tecidos (26), associada à crescente demanda por transplante de tecido ósseo (24), o suprimento torna-se insuficiente (25).

Os enxertos heterólogos ou xenográficos ou xenoenxertos são os provenientes de outras espécies que não a humana e que serão transplantados para a espécie humana. Um exemplo deste tipo de enxerto é o EBL. Estudos comprovam a sua semelhança química e física com o osso humano (27, 28), assim como os bons resultados clínicos do seu uso em humanos (28-30, 100, 113, 114), assim como do seu uso em animais (115). Estes enxertos possuem a capacidade osteocondutora, sendo, portanto bons suportes para a neoformação óssea (25, 103). Porém por serem tecidos provenientes de outras espécies, podem levar ao desenvolvimento de uma resposta imunológica ou inflamatória (27). Mas alguns autores (20, 30, 100, 116) têm realizado processos diferenciados, como a criodessecação (*freeze-drying* ou liofilização) para coibir ao máximo a imunogenicidade destes enxertos assim como reduzir o número de partículas potencialmente patogênicas para o hospedeiro, tornando este tipo de enxerto seguro para o uso em humanos (28, 117, 118). Estes enxertos podem ser produzidos em larga escala para o tratamento de grandes falhas/defeitos ósseos e não dependem de sítio de doação ou de doadores como os enxertos autólogos e alográficos (26).

3.4 Biópsia óssea

Diversos estudos (25, 27-30, 100, 103, 113, 114) já demonstraram avaliações com bons resultados associados ao uso dos diversos tipos de enxertos ósseos, entretanto estes

estudos utilizaram-se de parâmetros e critérios subjetivos (critérios clínicos e radiológicos) para avaliar tais resultados. Considera-se a biópsia associada à análise histológica como o único método a avaliar de forma objetiva e fidedigna a real eficácia dos diferentes tipos de enxerto quanto à presença de neoformação óssea e também quanto à osteointegração (31).

Porém poucos estudos até o presente momento demonstraram esta análise histológica em humanos (100, 119-124). Muitos destes estudos com biópsia e subsequente análise histológica em humanos foram realizados após o diagnóstico clínico de falha da enxertia ou óbito (119, 120, 122), poucos são os artigos que relatam os resultados de enxertias realizadas em pacientes humanos sem importantes complicações clínicas ou falhas associadas ao uso do enxerto (100, 121). Também se salienta que a grande maioria dos estudos desenvolvidos até o presente momento envolveu a análise de enxertos autólogos (autográficos) ou enxertos homólogos (alográficos) (119-121) e apenas um único estudo, publicado descreveu os achados da análise histológica do uso de enxerto heterólogo (xenográfico) em humanos (100).

Também são raros os estudos que reportem como resultados da análise de biópsias de enxertos ósseos realizados em humanos a proporção de enxerto remanescente e a proporção de neoformação óssea, assim como artigos que tentem fazer uma relação do tempo de enxertia-tempo de biópsia (*follow-up*) com a absorção do enxerto ou com a neoformação óssea (100, 125). Schereurs e Buma (125) acreditam que em geral 90% do enxerto utilizado deve estar absorvido num período de oito anos após a enxertia. Esta conclusão dos autores foi baseada em um estudo de 25 biópsias com respectiva análise histológica em casos de uso de enxerto alográfico proveniente de banco de tecidos para correção de defeitos ósseos acetabulares. Meyer *et al.* (100), no único estudo a mostrar a análise histológica de enxertos xenográficos demonstra em um período de 11 meses de *follow-up* 47% de enxerto bovino remanescente.

Portanto observa-se que são raros os artigos encontrados literatura a discutir a análise histológica dos enxertos ósseos, um dos tecidos mais transplantados na atualidade (21-23).

4 Objetivos

4.1 Objetivo geral

Verificar a presença de neoformação óssea através da análise histológica em pacientes submetidos à cirurgia de ATQR em que foi utilizado o EBL.

4.2 Objetivos específicos

Quantificar a neoformação óssea;

Verificar a existência ou não de EBL nas amostras estudadas e quantificar caso exista;

Verificar a existência de uma possível relação entre quantidade de osso neoformado e a quantidade de EBL remanescente;

Verificar a existência de uma relação entre o tempo decorrido entre as ATQR (primeira revisão na qual o EBL foi utilizado e a segunda revisão na qual foi coletado material para análise histológica) e a neoformação óssea;

Verificar possíveis diferenças entre os gêneros (masculino e feminino);

Descrever as características da população estudada.

5 MÉTODOS

5.1 Delineamento

Estudo de Casos

5.2 Amostra

Amostra de conveniência.

5.3 Período de coleta de dados

O período de coleta de dados foi de Julho de 2000 a Abril de 2013.

5.4 População-alvo

A população deste estudo abrangeu sujeitos que foram submetidos a uma cirurgia de ATQR onde foi utilizado o EBL os quais internaram para realizar uma segunda cirurgia de ATQR.

5.4.1 Critérios de inclusão

- Sujeitos submetidos a uma cirurgia de ATQR pelo diagnóstico de deficiência acetabular secundária (causada pelo desgaste do polietileno e/ou pela soltura asséptica do componente de polietileno acetabular) em uma ATQ primária. Nesta cirurgia de ATQR que foi indicada e ao quais os sujeitos foram submetidos, tem que ter sido utilizado o EBL;
- Nestes mesmos sujeitos submetidos à ATQR haver posteriormente um diagnóstico de falha mecânica do implante levando a uma luxação recorrente da prótese revisada. A luxação recorrente tem que ser devido ao posicionamento inadequado do componente acetabular (mínimo grau de anteversão e/ou inclinação do componente acetabular). Fator este que indicou uma segunda cirurgia de ATQR.

5.4.2 Critério de exclusão

- O paciente não desejar participar do estudo.

5.5 Variáveis coletadas

5.5.1 Variáveis coletadas no prontuário e com o paciente

Foram coletados no momento da internação do paciente dados demográficos tais como nome, sexo, data de nascimento, endereço e telefone(s) de contato. Também foram coletados dados referentes à data de internação e data de alta hospitalar, com a finalidade de estabelecer o tempo de internação, o qual foi calculado em dias. Assim como foram coletadas a data da primeira cirurgia de ATQR (na qual foi utilizado o EBL) e a data da segunda cirurgia de ATQR (na qual foi coletado o material para análise histológica). Estas datas foram coletadas com a finalidade de estabelecer o tempo de reintervenção, o qual foi calculado em meses.

Dados referentes ao uso de tabaco e ao consumo de bebidas alcoólicas também foram investigados, assim como o histórico de patologias prévias do paciente.

Os pacientes foram questionados e examinados no momento da internação, na busca de sinais clínicos de resposta inflamatória ou infecciosa. Estes sinais foram considerados quando presentes no membro que foi operado de ATQR ou diretamente no sítio da cirurgia de ATQR: *rash* (erupção cutânea), prurido, dor na região glútea e/ou na virilha, calor no local da cirurgia, hiperemia no local da cirurgia, edema e drenagem de secreção no local da cirurgia.

5.5.2 Variáveis coletadas nas lâminas

Nas lâminas histológicas foram buscadas as informações referentes à proporção de EBL remanescente e a proporção de neoformação óssea (osso novo). Também

se buscou a presença de tecido fibrótico e de resposta inflamatória (indicado pela presença de neutrófilos) nas lâminas.

5.6 Coleta de material, preparação das lâminas e análise histológica

O EBL usado na primeira cirurgia de ATQR foi coletado através de biópsia em todos pacientes que satisfizeram os critérios de inclusão deste estudo e que consentiram e acordaram em participar deste estudo. A coleta foi feita através de agulhas de biópsia de Yamshidi. O material coletado tinha um tamanho médio de 6mm de comprimento e 2 mm de largura. Imediatamente após a biópsia o material foi colocado em fixador apropriado e encaminhado ao setor de patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). As peças foram mantidas em formalina tamponada 10% em um volume 10 vezes maior que o volume das peças. Foram mantidas na solução por um período de 12 a 16 horas. Após este período as peças foram colocadas no ácido nítrico 10% com a finalidade de serem descalcificadas (processo para remover o fosfato de cálcio do material a ser analisado). Este período de descalcificação teve duração de 24 horas. Após a descalcificação o material de biópsia foi colocado em moldes/blocos de parafina. Os blocos de parafina então foram cortados com uma espessura de 200 μm e então corados em solução de hematoxilina-eosina. O EBL apresentou à observação no microscópio a cor azul e o osso neoformado (neoformação óssea) uma cor rosada. As laminas foram vistas através de um microscópio (*Axiolab E, Carl Zeiss, Göttingen, Germany*) numa magnificação de 50 vezes a 100 vezes. Estes valores de magnificação foram baseados no estudo de Meyer *et al.* (100), assim como observamos que estes parâmetros foram os melhores para quantificar as proporções de neoformação óssea e quantificar as proporções de EBL remanescentes. Cada lâmina vista foi dividida em quatro partes. As imagens destas quatro partes foram digitalizadas e importadas pra o programa *Image J 1.40*,

um programa fornecido gratuitamente pelo *National Institute of Health* dos Estados Unidos da América (EUA) (126). Este programa proporcionou com que fossem calculadas as proporções (em porcentagem) de osso neoformado e de EBL remanescente na área de matriz mineralizada em cada uma das quatro partes de cada lâmina. A média resultante da avaliação de cada um desses quatro campos foi o valor que foi utilizado para definir as proporções de osso neoformado e de EBL. Foram analisados nas laminas a presença de fibrose e resposta inflamatória, esta última evidenciada pela presença de neutrófilos.

5.7 Registro e processamento dos dados

Para a coleta dos dados foi utilizado um formulário de preenchimento (**Anexo A**). O preenchimento destes dados na ficha e o exame realizado no momento da internação não interferiram de maneira alguma na assistência do paciente.

5.8 Estruturação do banco de dados e análise estatística

O banco de dados foi estruturado com o com o programa estatístico *Statistical Package for The Social Sciences* (SPSS 18.0).

A análise dos dados também foi realizada com o programa estatístico *Statistical Package for The Social Sciences* (SPSS 18.0).

Foram determinadas as médias e dispersão das variáveis quantitativas, e as proporções das qualitativas. A normalidade das variáveis quantitativas foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a avaliação de possíveis associações entre as variáveis foi utilizado o teste Pearson. Para análise de possíveis diferenças na proporção de osso neoformado e de EBL remanescente entre os diferentes gêneros foi utilizada a análise de variância através do teste de ANOVA. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para identificar diferenças de idade entre os gêneros. Considerou-se significativo quando o valor de $p < 0,05$.

5.9 Aspectos éticos

Este projeto registrado sob o número 100535 foi submetido e aprovado pela Comissão Científica e Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/Ministério da Saúde (MS) e pelo *Office for Human Research Protections* (OHRP)/USDHHS com *Institutional Review Board (IRB)* n°IRB00000921.

Todos os sujeitos foram convidados a participar da pesquisa e foram esclarecidos sobre a pesquisa e seus objetivos antes da realização do procedimento cirúrgico de ATQR e coleta de material para análise histológica. Os sujeitos concordantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo B). Também foi garantida a proteção dos sujeitos de pesquisa através do Termo de Confidencialidade (TC) (Anexo C), assim como todos os membros integrantes e participantes do projeto assinaram o Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas fornecido pela instituição (HCPA).

6 ARTIGO ORIGINAL

6.1 Artigo em português

ENXERTO XENOGRÁFICO LIOFILIZADO: UMA SÉRIE DE CASOS DE BIÓPSIAS ANALIZADAS HISTOLOGICAMENTE

Tiango Aguiar Ribeiro^{1,2}, Caroline Coussirat³, Fernando Pagnussato^{3,4}, Cristiano Valter Diesel^{1,2}, Fernando Castilla de Souza Macedo², Carlos Alberto de Souza Macedo², Carlos Roberto Galia^{1,2,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brasil

² Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brasil

³ Banco de Multitecidos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brasil

⁴ Curso de Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brasil

Resumo

Contexto: A reconstrução de um defeito ósseo acetabular é um dos aspectos mais importantes de uma cirurgia de artroplastia total de quadril de revisão. Ela pode ser feita pelo uso de enxertos. Para isto, diversos tipos de enxertos podem ser usados e o enxerto liofilizado bovino é um exemplo e uma alternativa.

Objetivo: O propósito deste estudo foi avaliar os achados histológicos do enxerto ósseo bovino liofilizado usado em prévias cirurgias de revisão de artroplastia total de quadril.

Delineamento: Uma série de casos foi realizada de Julho de 2000 a Abril de 2013 com a aprovação do comitê de ética do Hospital.

Cenário: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Sul do Brasil.

Resultados: Quatorze sujeitos foram analisados. Destes, 64,3% eram do sexo feminino. A média de idade dos pacientes foi $52,36 \pm 18,55$. Neoformação óssea estava presente em 85,7% dos sujeitos, e constituiu 61,79% da área total de matriz óssea. O diagnóstico de absorção óssea estava presente em 12 sujeitos. Uma forte correlação de proporção inversa foi constatada pelo teste de Pearson entre a porcentagem de osso neoformado e a porcentagem de osso xenográfico na área total de matriz óssea quando foram analisadas histologicamente as biópsias ($p=0,001$). Nenhuma resposta inflamatória foi encontrada no exame clínico dos pacientes ou na análise histológica das biópsias.

Conclusão: O osso bovino liofilizado demonstrou ser seguro até o presente momento e com resultados aceitáveis. A maioria dos casos apresentou neoformação óssea como o esperado (considerado valores maiores que 30%) e por esta razão o xenoenxerto provou ser uma estrutura/treliça osteocondutora compatível para o crescimento de osso novo. Portanto, ele pode ser considerado uma alternativa aos outros enxertos ósseos no tratamento das falhas ósseas.

Palavras-chave: Liofilização; Xenoenxerto; Biópsia; Transplante; Heterólogo; Artroplastia Total de Quadril;
Artroplastia de Revisão; Osso Bovino.

Introdução

O tratamento das falhas ósseas é requerido em diversos procedimentos ¹ e tem se tornado particularmente comum² nas cirurgias reconstitutivas, especialmente na cirurgia reconstitutiva do quadril ^{3,4}. A reconstrução de um defeito ósseo acetabular é um dos pontos mais importantes na cirurgia de artroplastia total de quadril de revisão ⁵. O tratamento desta falha óssea pode ser feito pelo uso de enxertos⁶. Por esse motivo o osso tem se tornado um dos tecidos mais transplantados ⁷⁻⁹.

Três tipos de enxerto podem ser usados para cirurgia de reconstrução do quadril: autólogo ou autógeno ou autoenxerto, o aloenxerto ou homólogo e o xenoenxerto ou heterólogo. Contudo, a escolha do tipo de enxerto deve levar em consideração três importantes propriedades: (1) uma matriz osteocondutora para suportar a deposição de osso novo; (2) fatores osteoindutores (proteínas) para formar células osteoprogenitoras e induzir formação de osso; (3) osteoblastos ou precursores dos osteoblastos (células osteogênicas) para estimular a regeneração óssea ^{6,10}. Estas três propriedades variam, dependendo do tipo de enxerto ósseo.

O objetivo deste estudo foi avaliar os achados histológicos do enxerto bovino liofilizado usado em uma prévia cirurgia de artroplastia total de quadril de revisão. Nós avaliamos na análise histológica a presença de neoformação óssea e a quantidade de xenoenxerto remanescente. Em nosso melhor entendimento, este é um dos poucos estudos mostrando os achados de neoformação óssea e sua correlação com a quantidade de xenoenxerto no local da biópsia.

Materiais e métodos

Um estudo de casos foi realizado de Julho de 2000 a Abril de 2013 após a aprovação do Comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) (IRB 00000921). O estudo foi conduzido de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975 e todos os pacientes concordaram em participar e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido previamente ao procedimento cirúrgico e a biópsia. O propósito deste estudo foi relatar e estudar os achados histológicos de biópsias realizadas em quadris previamente submetidos à cirurgia de artroplastia total de quadril de revisão na qual foi utilizado o enxerto bovino liofilizado.

Os pacientes recrutados em nosso estudo preencheram todos os critérios de inclusão listados abaixo:

- Diagnóstico de deficiência acetabular secundária causado por falha mecânica do implante (desgaste do polietileno e/ou soltura asséptica do componente acetabular) em uma artroplastia total de quadril primária. Este foi o motivo pelo qual foi indicada a cirurgia de artroplastia total de quadril de revisão na qual foi utilizado o enxerto bovino liofilizado.
- Diagnóstico de falha mecânica do implante levando a luxações recidivantes da artroplastia total de quadril revisada devido ao posicionamento inadequado do componente acetabular (poucos graus de angulação na anteversão e/ou na inclinação do componente acetabular). Este foi o motivo pelo qual foi indicada a segunda cirurgia de artroplastia total de quadril de revisão na qual a biópsia foi realizada;

Todos estes casos mostraram dificuldade durante a remoção do componente acetabular cimentado, que estava fixado no acetábulo hospedeiro previamente enxertado.

Biópsia e análise histológica

O osso bovino liofilizado usado na primeira cirurgia de revisão foi coletado através de biópsia em todos os pacientes os quais satisfizeram todos os critérios de inclusão e que concordaram em participar deste estudo. A coleta do material foi feita por agulhas de Yamshidi. As biópsias tinham um comprimento médio de 6 mm e um diâmetro de 2 mm. Imediatamente após a biópsia o material foi colocado em fixador adequado e encaminhado ao setor de patologia do nosso hospital. As peças foram fixadas por 12 a 16 horas em formalina 10% com volume dez vezes maior que o volume das amostras. Após foram levadas para a descalcificação por 24 horas, processo que removeu o fosfato de cálcio do osso. Esse processo utilizou ácido nítrico a 10%. Após a descalcificação as amostras foram embebidas em parafina. As peças de parafina foram cortadas transversalmente em uma espessura de 200 µm e coradas em solução de hematoxilina-eosina. O xenoenxerto liofilizado tornou-se azul e o osso neoformado rosa. As laminas foram visualizadas através de um microscópio (*Axiolab E, Carl Zeiss, Göttingen, Germany*) em uma magnificação de 50x e 100x. Estes valores de magnificação foram baseados no artigo de Meyer *et al.*¹, assim como nos observamos que estes valores foram os melhores valores de magnificação para quantificar as proporções de osso neoformado versus a quantidade de xenoenxerto remanescente. Cada lâmina visualizada foi dividida em quatro quadrantes. As imagens destes quatro quadrantes foram digitalizadas e importadas para o software *Image J 1.40*, um programa do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos da América¹¹. Este programa foi usado para calcular a porcentagem de osso neoformado e de enxerto bovino liofilizado na matriz óssea mineralizada em cada um dos quatro quadrantes. A média resultante da avaliação um desses quatro campos é o valor que foi utilizado para definir as proporções de osso neoformado e da quantidade de enxerto

lioofilizado. A presença de fibrose e uma resposta inflamatória, indicada pela presença de neutrófilos, também foi analisado.

Variáveis de desfecho

A ausência de osso neoformado foi considerada como quantidade inferior a 30% de neoformação óssea na área total de matriz, portanto a ausência de absorção do enxerto bovino lioofilizado foi considerada como uma quantidade superior a 70% de enxerto lioofilizado na área total da matriz. Estas proporções foram baseadas no estudo de Meyer *et al.*¹, no qual o autor encontrou 47% de osso lioofilizado remanescente e concluiu que o enxerto bovino era viável e apresentava bons resultados de osteointegração e osteocondução. Nós, arbitrariamente, aumentamos este valor e consideramos valores superiores a 70% como não compatíveis com neoformação óssea ou compatível com a manutenção do xenoenxerto sem a absorção e sem neoformação.

Informações sobre idade, gênero, tempo de internação, data de alta, tempo de reintervenção e achados clínicos de resposta inflamatória ou antigênica foram coletados durante a internação hospitalar. O tempo de reintervenção ou tempo de *follow-up* foi considerado o tempo entre a primeira cirurgia de revisão e a segunda cirurgia de revisão (foi calculado em meses). O tempo de internação hospitalar foi calculado como o intervalo entre a data de admissão hospitalar e a data de alta (foi calculado em dias). Reação inflamatória foi considerada como a presença de ao menos um dos seguintes critérios: *rash* (erupção cutânea), prurido, dor na virilha ou na nádega, calor no local, hiperemia, edema e drenagem de secreção.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada no software SPSS versão 18 (SPSS Inc., IBM Corporation, Armonk, New York). As variáveis quantitativas foram descritas por suas media,

desvio padrão, mediana e interquartil (IQ). As variáveis qualitativas foram descritas por suas frequências. As correlações foram analisadas pelo teste de Pearson. O teste de Mann-Whitney para identificar diferenças de idade entre os gêneros. A análise de variância (ANOVA) foi usada para identificar diferenças na quantidade de osso neoformado e enxerto bovino liofilizado entre os dois diferentes gêneros. Diferenças significativas no estudo foram consideradas quando o valor de p foi $<0,05$.

Resultados

Quatorze sujeitos foram incluídos neste estudo. As características desta população estão expostas na Tabela 1. Existem consideravelmente mais mulheres do que homens em nossa amostra. A média±desvio padrão para a idade no momento da reintervenção 61 ± 16 (mediana 60, IQ 52–77) para as mulheres e 37 ± 12 anos (mediana 43, IQ 25–47) para os homens ($p=0,007$). A média±erro padrão do tempo entre a primeira cirurgia de artroplastia total de quadril de revisão, na qual o xenoenxerto foi utilizado, e a segunda cirurgia de artroplastia total de quadril de revisão, na qual a biópsia foi realizada, foi $70,07\pm 13,94$ meses (mediana 62, IQ 42,75–97,4). Nenhuma correlação foi encontrada entre a quantidade de osso neoformado e o tempo entre a primeira e a segunda cirurgia de revisão ($p=0,317$ e $r=0,288$).

Resultados da análise histológica

Um padrão histológico homogêneo foi encontrado nas lâminas quando analisadas pelo patologista. Todas as amostras apresentaram tecido fibroso, neoformação óssea, e enxerto bovino liofilizado parcialmente reabsorvido (Figura 1).

A proporção média de neoformação óssea nas amostras foi $61,79 \pm 22,49\%$ (média \pm desvio padrão); a proporção média de enxerto liofilizado bovino foi de $38,21 \pm 22,5\%$. Este resultado demonstrou que a medida que o xenoenxerto bovino era absorvido aumentava a quantidade de osso neoformado. Doze amostras mostraram neoformação óssea duas não mostraram neoformação (menor que 30% de osso neoformado presente na matriz total). A correlação entre o osso neoformado e o enxerto bovino liofilizado foi analisada pelo teste de correlação de Pearson ($p=0,001$ e $r=-1,00$). Isto sugere uma forte correlação inversa entre as variáveis estudadas, indicando que quando uma aumenta a outra diminui.

Apenas duas amostras não mostraram neoformação óssea. Contudo, estas amostras mostraram a manutenção de uma grande quantidade de xenoenxerto bovino e uma pequena quantidade de osso neoformado. (Figura 2).

Apenas um sujeito do estudo apresentou neutrófilos na análise histológica, e em uma pequena quantidade, o que indica que não existiu reação inflamatória ao enxerto liofilizado. Estes achados correlacionam-se com o status clínico do paciente (sem sinais clínicos de infecção ou reação neste paciente).

Tabela 1 - Características

Média (DP) Idade (anos)	52,36 (18,55)
Gênero (n, %)	
Masculino	5 (35,7)
Feminino	9 (64,3)
Tempo de internação hospitalar (dias) [média (DP), mediana (IQ)]	12,21 (9,06), 10 (7–14)
Tempo de reintervenção (meses) [média (DP), mediana (IQ)]	63,5 (45,84), 60,5 (18,25–90,25)
Absorção do enxerto liofilizado (n, %)	
Sim	12 (85,7)
Não	2 (14,3)
Enxerto bovino liofilizado (%) [média (DP), mediana (IQ)]	38,21 (22,5), 35,5 (21–50,25)
Neoformação óssea (n, %)	
Sim	12 (85,7)
Não	2 (14,3)
Neoformação óssea (%) [média (DP), mediana (IQ)]	61,79 (22,49), 64,5 (49,75–79)
Fibrose (n, %)	
Sim	14 (100)
Não	-
Inflamação - neutrófilos (n, %)	
Sim	1 (7,1)
Não	13 (92,9)
<hr/>	
DP=	Desvio padrão
IQ=	Interquartil

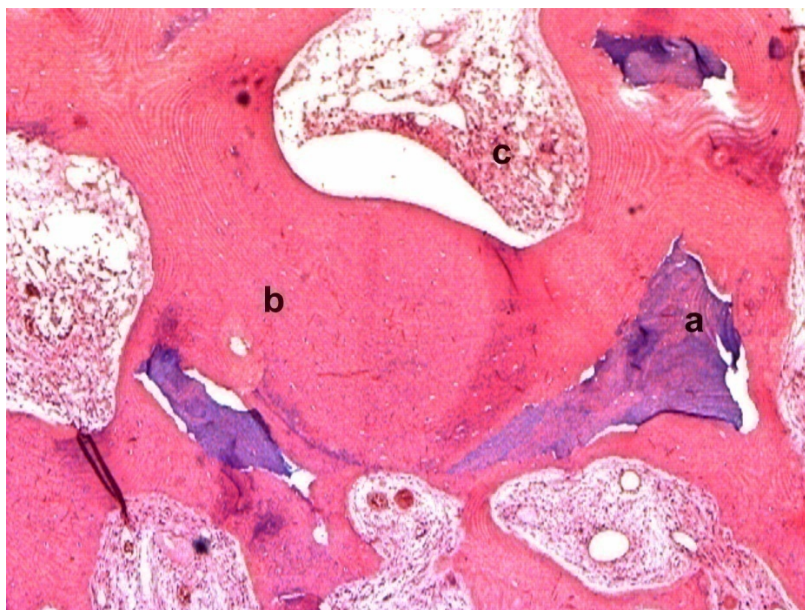


Figura 1 – Uma lamina histológica em um corte transversal de 200 μm em uma magnificação de 100x mostrando o enxerto bovino liofilizado (azul) e o osso neoformado (rosa). **a)** Enxerto bovino liofilizado; **b)** Novo osso; **c)** Tecido fibroso.

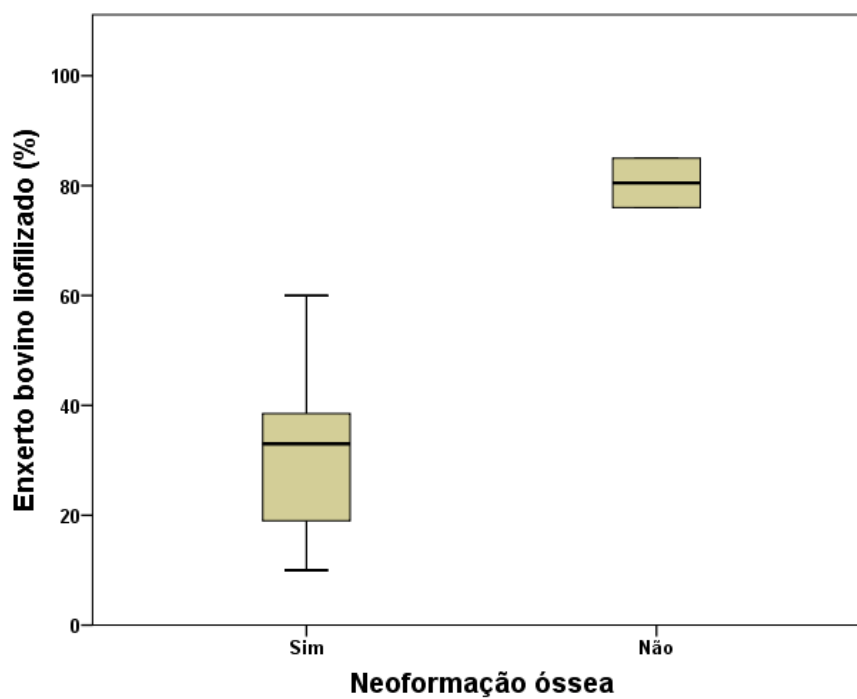


Figura 2 – Distribuição mostrando a proporção máxima e mínima e o interquartil de enxerto liofilizado, assim como a média na presença ou ausência de neoformação óssea.

Discussão

O enxerto ósseo autólogo ou autógeno é considerado o “padrão ouro”^{1,6,10}. Ele é superior devido à presença de três propriedades (osteocondução, osteoindução e a devido a presença de osteoblastos), assim como devido a ausência de risco de transmissão de doenças e do desenvolvimento de imunogenicidade⁶. No entanto, existem várias complicações, como o limite da oferta de osso autógeno, complicações no sítio de doação, infecção, hematoma e hemorragia^{1,6,10,12-14}.

Os enxertos alográficos ou homólogos são uma alternativa e consistem em transplante ósseo entre seres da mesma espécie (alogênico)¹⁵. A demanda por este tipo de enxerto tende a aumentar¹⁶, mas o atual aporte é pequeno¹⁰. No nosso país (Brasil), a dificuldade de criar e manter um banco de tecidos, especialmente um banco de tecidos ósseos, torna o enxerto homólogo insuficiente em quantidade para suplantar a demanda requerida por enxertos ósseos. Pois mesmo em nosso hospital existindo um banco de ossos, a proporção de doadores de tecidos em relação à proporção de pessoas que necessitam o uso de enxertos é extremamente baixa. O que faz a oferta de enxerto alogênico inferior à disponibilidade de osso bovino liofilizado produzido em larga escala. Outro fator é que o enxerto alográfico apresenta um risco elevado de transmissão de doenças e tumores^{2,4,16-18}. Diversos estudos têm mostrado que este tipo de enxerto pode induzir a resposta do sistema imunológico do hospedeiro^{6,15,19,20}. Esta situação pode representar um potencial problema na prática clínica^{6,10}.

Os enxertos xenográficos são transplantes ósseos entre espécies diferentes e o enxerto bovino liofilizado é um exemplo deste tipo de enxerto. Este enxerto tem disponibilidade quase

ilimitada e grande semelhança física e química ao osso humano ^{21,22} sendo um enxerto osteocondutor. Este estado osteocondutor é incontestável e foi confirmado pela presença de uma proporção significativa de osso novo nas lâminas analisadas, o que não seria possível sem a presença de uma boa e compatível estrutura de suporte ou treliça ^{6,10}. A estrutura ou treliça adequada suporta o crescimento do novo osso regenerado pelo tecido ósseo local ^{6,10}. No entanto, uma desvantagem dos xenoenxertos é que eles podem desencadear uma indesejada reação imunológica e inflamatória no hospedeiro ²¹. No entanto, foram feitos muitos esforços para minimizar os riscos e diminuir a antigenicidade do enxerto bovino liofilizado ^{1,23}, tal como o processo de liofilização, o qual é utilizado neste estudo. Essas melhorias fazem do enxerto bovino liofilizado uma boa escolha para o tratamento das perdas ósseas ^{21,22}, e diversos estudos demonstraram seu uso em humanos ^{1,22-26} e animais ²⁷. Nenhum estudo demonstrou uma associação entre enxerto liofilizado e a presença de reação ou infecção ^{24,26}, assim como a associação entre o uso deste tipo de enxerto e a doença da encefalopatia espongiforme bovina (EEB) e sua nova variante a doença de Creutzfeldt-Jakob (DCJ). A segurança da utilização deste enxerto em relação à DCJ se torna possível porque o processo de liofilização quimicamente inativa a maior parte dos agentes bacterianos, agentes virais e agentes priônicos (prions) para um limite de segurança para o uso em seres humanos ^{22,28,29}, fazendo o enxerto bovino seguro para uso em humanos. Xenoenxertos são uma opção excelente de enxerto, considerando os bons resultados clínicos, consolidação, ausência de dor e ausência de reação antigênica ^{22,23,25}. No entanto, todos estes estudos ²²⁻²⁶, com resultados positivos, avaliaram apenas os achados clínicos e radiológicos. Apenas um artigo ¹ mostrou um bom resultado quando se analisa os resultados da biópsia por histologia. Nosso estudo é o segundo na literatura em analisar histologicamente biópsias e transplante de osso xenográfico.

Meyer *et al.*¹, em seu estudo comparou as biópsias de dois procedimentos em que foi utilizado o enxerto autólogo versus sete procedimentos em que foi utilizado o Tutobone® (xenoenxerto bovino) durante um seguimento de 11 meses, e ele demonstrou que as proporções do xenoenxerto remanescentes e de neoformação óssea foram de 47% e 53%, respectivamente. Nosso estudo, que teve o dobro do número de indivíduos e um seguimento médio maior, de 63,5 meses, mostrou 38,21% de xenoenxerto remanescente e 61,79% de osso neoformado. Uma explicação dos resultados superiores nas análises pode ser devido ao nosso processo de liofilização que modifica em algumas fases o processo de liofilização de Kakiuchi *et al.*³⁰ o qual foi usado por Meyer *et al.*¹. Outra explicação para a presença de uma maior neoformação óssea em nossos resultados foi o longo tempo de seguimento. No entanto, isto é controverso. Instintivamente, seria de esperar uma maior quantidade de neoformação óssea com um maior tempo de seguimento; no entanto, estatisticamente essa correlação não foi confirmada. Nossa casuística demonstra que quando o osso liofilizado é absorvido, o novo osso é formado.

Duas amostras mostraram baixos valores de neoformação óssea, indicando pequena atividade osteoblástica próximo do enxerto. As proporções de neoformação óssea/xenoenxerto no total da matriz mineralizada nestes dois casos foram 15%/85% e 24%/76%. Estes resultados demonstram baixa atividade óssea no local da biópsia e nos convidam a refletir sobre o fator que pode ter afetado a neoformação óssea nesses pacientes. Este fator pode ser biológico ou mecânico, e pode influenciar o reparo ósseo local. É importante e interessante notar que um desses dois pacientes apresentou síndrome de McCune-Albright. Uma das três principais características desta doença que pode afetar o metabolismo ósseo é a displasia fibrosa poliostótica; como os pacientes também têm disfunções hormonais, como o hiperparatireoidismo e hipertireoidismo³¹. Outro fato é que esses dois pacientes foram os únicos fumantes na série de 14 pacientes. Acreditamos que as

mudanças causadas pelo tabagismo podem ter levado a um resultado desfavorável na neoformação óssea. Mesmo os dois pacientes não apresentando bons índices de neoformação óssea, eles não tiveram quaisquer queixas clínicas de dor ou incapacidade ou sinais radiológicos da presença de áreas de radioluscência ou áreas de déficit de consolidação.

O uso de enxertos ósseos para restaurar defeitos ósseos na reconstrução acetabular tornou-se uma realidade viável e foi relatado e popularizada por Slooff *et al.*³². Vários autores demonstraram taxas de sobrevivência de 90,8% em 35,8 meses^{33,34}, 95% em 51 meses³⁵, e 94% em 11,8 anos³⁶. No entanto, a avaliação da integração do enxerto, nestes casos, é bastante complexa, mesmo quando existe critérios propostos³⁷ para avaliar a integração do enxerto radiograficamente. Apenas a biópsia pode demonstrar real integração³⁸, e nosso estudo é um dos poucos estudos a demonstrar os resultados de biópsias em relação ao xenoenxerto bovino liofilizado.

Nosso estudo tem diversas limitações. O local onde as biópsias foram feitas pode ter sido em uma área com uma grande ou uma pequena quantidade de xenoenxerto/osso neoformado. Então, isto pode não ter refletido a real situação dos sujeitos da pesquisa. Somando-se, nós não avaliamos quanto de enxerto ósseo bovino liofilizado foi usado na primeira cirurgia de revisão. Apesar destas limitações, o presente estudo tem um longo acompanhamento (*follow-up*) e um grande número de sujeitos comparados com o único outro estudo¹ que realizou análise histológica em biópsias de casos clínicos em que foi utilizado um xenoenxerto.

Em conclusão, o uso de enxerto bovino liofilizado é seguro, devido à ausência, até o momento atual, de resposta inflamatória, e à ausência de morbidade do local doador. Além disso, o enxerto liofilizado bovino pode ser utilizado para uma perda óssea de maior proporção não dependendo do sítio doador como os enxertos autólogos. O enxerto bovino

liofilizado pode ser produzido em grande escala, têm principalmente bons resultados clínicos e mostraram resultados satisfatórios na análise histológica.

Referências

1. Meyer S, Floerkemeier T, Windhagen H. Histological osseointegration of Tutobone: first results in human. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. Jun 2008;128(6):539-544.
2. Sugihara S, van Ginkel AD, Jiya TU, van Royen BJ, van Diest PJ, Wuisman PI. Histopathology of retrieved allografts of the femoral head. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. Mar 1999;81(2):336-341.
3. Slooff TJ, Buma P, Schreurs BW, Schimmel JW, Huiskes R, Gardeniers J. Acetabular and femoral reconstruction with impacted graft and cement. *Clinical orthopaedics and related research*. Mar 1996(324):108-115.
4. Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Camargo LM, Marinho DR, Moreira LF. Femoral and acetabular revision using impacted nondemineralized freeze-dried bone allografts. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association*. May 2009;14(3):259-265.
5. Buckup J, Salinas EA, Valle AG, Boettner F. Treatment of large acetabular defects: a surgical technique utilizing impaction grafting into a metallic mesh. *HSS journal : the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery*. Oct 2013;9(3):242-246.
6. Drosos GI, Kazakos KI, Kouzoumpasis P, Verettas DA. Safety and efficacy of commercially available demineralised bone matrix preparations: a critical review of clinical studies. *Injury*. Sep 2007;38 Suppl 4:S13-21.
7. Williams A, Szabo RM. Bone transplantation. *Orthopedics*. May 2004;27(5):488-495; quiz 496-487.

8. Knaepler H, Laubach S, Gotzen L. [The bone bank--a standardized procedure? Results of a federal survey of German surgical clinics]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizen*. Nov 1990;61(11):833-836.
9. Campbell DG, Oakeshott RD. Bone allograft banking in South Australia. *The Australian and New Zealand journal of surgery*. Dec 1995;65(12):865-869.
10. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. Mar 2002;84-A(3):454-464.
11. Health NIO. ImageJ Disclaimer. 2004; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Accessed 01/04/2013, 2013.
12. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clinical orthopaedics and related research*. Aug 1996(329):300-309.
13. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *Journal of orthopaedic trauma*. 1989;3(3):192-195.
14. Schnurer SM, Gopp U, Kuhn KD, Breusch SJ. [Bone substitutes]. *Der Orthopade*. Jan 2003;32(1):2-10.
15. Friedlaender GE. Bone allografts: the biological consequences of immunological events. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. Sep 1991;73(8):1119-1122.
16. Palmer SH, Gibbons CL, Athanasou NA. The pathology of bone allograft. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. Mar 1999;81(2):333-335.
17. 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. *The Journal of arthroplasty*. Feb 2002;17(2):158-164.

18. Heliotis M, Tsiridis EE. Fresh frozen bone in femoral impaction grafting: can developments in bone regeneration improve on this? *Medical hypotheses*. Dec 2001;57(6):675-678.
19. Horowitz MC, Friedlaender GE, Qian HY. The immune response: the efferent arm. *Clinical orthopaedics and related research*. May 1996(326):25-34.
20. Horowitz MC, Friedlaender GE. Immunologic aspects of bone transplantation. A rationale for future studies. *The Orthopedic clinics of North America*. Apr 1987;18(2):227-233.
21. Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Mello TM, Camargo LM, Moreira LF. In vitro and in vivo evaluation of lyophilized bovine bone biocompatibility. *Clinics*. Dec 2008;63(6):801-806.
22. 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*. Aug 2008;63(4):509-514.
23. Morax S, Hurbli T, Smida R. [Bovine heterologous bone graft in orbital surgery]. *Annales de chirurgie plastique et esthetique*. Aug 1993;38(4):445-450.
24. Ledford CK, Nunley JA, 2nd, Viens NA, Lark RK. Bovine xenograft failures in pediatric foot reconstructive surgery. *Journal of pediatric orthopedics*. Jun 2013;33(4):458-463.
25. Maffulli N, Loppini M, Longo UG, Denaro V, Oliva F. Bovine xenograft locking Puddu plate versus tricalcium phosphate spacer non-locking Puddu plate in opening-wedge high tibial osteotomy: a prospective double-cohort study. *International orthopaedics*. May 2013;37(5):819-826.
26. Shibuya N, Jupiter DC, Clawson LD, La Fontaine J. Incorporation of bovine-based structural bone grafts used in reconstructive foot surgery. *The Journal of foot and*

- ankle surgery : official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons*. Jan-Feb 2012;51(1):30-33.
27. Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Mello TM. Uso de enxerto ósseo homólogo e heterólogo em diáfise femural de ratos: comparação entre enxerto ósseo congelado e liofilizado. *Rev Bras Ortop*. 2005;40:141-146.
 28. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials*. Jun 2001;22(12):1599-1606.
 29. Galia CR, Macedo CAdS, Rosito R, Moreira LF. Osteointegração de enxertos liofilizados impactados. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2009;17:24-28.
 30. 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. *International orthopaedics*. 1996;20(3):142-146.
 31. Farhat HL, Silva MRDd, Lazaretti-Castro M, Verreschi ITN. Evolução da displasia fibrosa óssea na síndrome de McCune Albright. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 1999;43:351-359.
 32. Slooff TJ, Schimmel JW, Buma P. Cemented fixation with bone grafts. *The Orthopedic clinics of North America*. Oct 1993;24(4):667-677.
 33. Buttaro M, Araujo GS, Araujo ES, Comba F, Piccaluga F. Viability of impacted bone allografts under metal mesh at the calcar in revision surgery of the hip. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. Feb 2008;90(2):228-231.
 34. Buttaro MA, Comba F, Pusso R, Piccaluga F. Acetabular revision with metal mesh, impaction bone grafting, and a cemented cup. *Clinical orthopaedics and related research*. Oct 2008;466(10):2482-2490.

35. Comba F, Buttaro M, Pusso R, Piccaluga F. Acetabular reconstruction with impacted bone allografts and cemented acetabular components: a 2- to 13-year follow-up study of 142 aseptic revisions. *The Journal of bone and joint surgery. British volume.* Jul 2006;88(7):865-869.
36. Schreurs BW, Slooff TJ, Buma P, Gardeniers JW, Huiskes R. Acetabular reconstruction with impacted morsellised cancellous bone graft and cement. A 10- to 15-year follow-up of 60 revision arthroplasties. *The Journal of bone and joint surgery. British volume.* May 1998;80(3):391-395.
37. Conn RA, Peterson LFA, Stauffer RN, Ilstrup D. Management of acetabular deficiency; long-term results of bone-grafting the acetabulum in total hip arthroplasty. *Orthop Trans.* 1985;9:451-452.
38. Schreurs BW, Busch VJ, Welten ML, Verdonschot N, Slooff TJ, Gardeniers JW. Acetabular reconstruction with impaction bone-grafting and a cemented cup in patients younger than fifty years old. *The Journal of bone and joint surgery. American volume.* Nov 2004;86-A(11):2385-2392.

6.2 Artigo em inglês

LYOPHILIZED XENOGRAFT: A CASE SERIES OF HISTOLOGICAL ANALYSIS OF BIOPSIES

Tiango Aguiar Ribeiro^{1,2}, Caroline Coussirat³, Fernando Pagnussato^{3,4}, Cristiano Valter Diesel^{1,2}, Fernando Castilla de Souza Macedo², Carlos Alberto de Souza Macedo², Carlos Roberto Galia^{1,2,3}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina (FAMED), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brasil

² Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brasil

³ Banco de Multitecidos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brasil

⁴ Curso de Biomedicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS), Brasil

Abstract

Background: The reconstruction of an acetabular bone defect is one of the most important aspects of revision total hip arthroplasty surgery. It can be done by the use of grafts. Therefore, many kinds of grafts may be used and lyophilized xenograft is an alternative example.

Objective: The purpose of the study was to evaluate the histological findings of lyophilized bovine xenografts used in previous total hip arthroplasty revision surgery.

Design: A case series was carried out from July 2000 to April 2013 with the approval of the Hospital Ethics Committee.

Setting: Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, South Brazil.

Results: Fourteen subjects were analyzed. Of these, 64.3% were female. The average age of the patients was 52.36 ± 18.55 . Neoformed bone was present in 85.7% of subjects, and constituted 61.79% of the total bone matrix area. The diagnosis of xenograft absorption was present in 12 subjects. A strong inverse correlation between the percentage of neoformed bone and the percentage of xenograft in the total bone matrix by analysis of biopsies was found by the Pearson test ($p=0.001$). No inflammatory response was found in the clinical status of the patients or in the histological analysis.

Conclusion: Lyophilized bovine xenograft shown to be safe until the present moment, with acceptable results. Most of the cases presented new bone formation as expected (considered values greater than 30%) and for this reason the xenograft has proven to be an osteoconductive compatible scaffold/trellis for the bone ingrowth. Therefore, it can be considered an alternative to other bone grafts in the treatment of bone loss.

Key Words: Freeze Drying; Xenograft; Biopsy; Transplantation; Heterologous; Lyophilized; Bovine Bone; Total Hip Arthroplasty; Revision Arthroplasty.

Introduction

Bone loss treatment is required in many procedures ¹ and has become particularly common ² in reconstructive surgeries, especially in hip reconstructive surgeries ^{3,4}. The reconstruction of an acetabular bone defect is one of the most important aspects of revision total hip arthroplasty surgery ⁵. This bone loss treatment can be done by the use of grafts ⁶. Therefore, bone has become one of the major transplanted tissues ⁷⁻⁹.

Three types of grafts can be used for hip reconstruction: autologous or autograft, allograft, and xenograft. However, the choice of graft type should take into account three important properties: (1) an osteoconductive matrix to support new bone deposition; (2) osteoinductive factors (proteins) to form osteoprogenitor cells and induce bone formation; (3) osteoblasts or osteoblast precursors (osteogenic cells) to stimulate bone regeneration ^{6,10}. These three properties vary, depending on the graft type.

The aim of this study was to evaluate the histological findings of lyophilized bovine xenografts used in a previous total hip arthroplasty revision surgery. We assessed in the histological analyses the presence of new bone formation and the quantity of xenograft. To the best of our knowledge, this is one of the few studies showing histological findings of bone neoformation and its correlation with the amount of xenograft on the biopsy site.

Materials and methods

A case series study was carried out from July 2000 to April 2013 after approval by the Institutional Review Board of *Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)* (IRB 00000921). The study was conducted in accordance with the 1975 Declaration of Helsinki and all patients provided informed consent prior to surgery and biopsy. The purpose of this study was to report the histological findings of biopsies of hip arthroplasty revision surgery in which a lyophilized xenograft was used.

The patients enrolled in our study fulfilled all of the following inclusion criteria:

- Diagnoses of a secondary acetabular deficiency caused by a mechanical failure of the implant (polyethylene wear and/or aseptic loosening of the acetabular component) in a primary total hip arthroplasty. That was the reason for indicating the first revision surgery in which the bovine lyophilized xenograft was used.
- Diagnosis of a mechanical failure of the implant leading to a recurrent dislocation of the revised prosthesis due to inadequate positioning of the acetabular component (minimum degree of anteversion and/or inclination of the acetabular component). That was the reason for indicating the second revision surgery in which the biopsy was done;

All these cases have shown difficulty during removal of cemented acetabular component, which was fixed in the previous grafted acetabulum host.

Biopsy and histological analysis

The bovine lyophilized xenograft used in the first revision surgery was collected through biopsy in all patients who satisfied all inclusion criteria and who agreed to participate in the study. The collection was done by Yamshidi needles. The biopsies had an average length of 6 mm and an average diameter of 2 mm. Immediately after the biopsy, the material was placed in an appropriate fixative and sent to the pathology sector of our hospital. The pieces were fixed for 12 to 16 hours in 10% buffered formalin with a volume 10 times higher than the sample volume. They were carried to a decalcifier for 24 hours that removed the calcium phosphate in the bone by the use of 10% nitric acid and then embedded in molten paraffin. The paraffin-embedded pieces were transversely cut to a thickness of 200 μm and stained in a hematoxylin-eosin solution. The lyophilized xenograft appeared blue and the neoformed bone tissue appeared pink. The glass slides were viewed under a microscope (*Axiolab E, Carl Zeiss, Göttingen, Germany*) in a 50x and a 100x magnification view, and these values of magnification was based on the Meyer *et al.*¹ article, as well as we observed that they were the best magnification to quantify the proportions of new bone formation versus the remaining xenograft. Each viewed slide was partitioned in four fields. The images of these four fields were digitalized and imported into Image J 1.40, a program of the National Institute of Health of the United States of America¹¹. This program was used to calculate the percentage of neoformed bone and lyophilized xenograft in the mineralized area of each of the four fields of view. The average rating resulting from the appraisal of these four fields is the value that was used to define the proportions of neoformed bone and the amount of lyophilized graft. The presence of fibrosis and an inflammatory response, indicated by the presence of neutrophils, was also analyzed.

Outcome variables

The absence of neoformed bone was considered as less than 30% of new bone in the total matrix, therefore the absence of graft absorption was considered as greater than 70% of

lyophilized bovine xenograft in the total matrix. These proportions have been defined based on the study of Meyer *et al.*¹, in which the authors found 47% of remaining xenograft, concluding that bovine xenograft is feasible and shows good results of osseointegration and osteoconduction. We arbitrarily increased this ratio and consider values greater than 70% as not compatible with bone neoformation or it is compatible with maintenance of bovine xenograft without absorption and without neoformation.

Information about age, gender, in-hospital stay, discharge date, reintervention time and clinical findings of antigenic or inflammatory reaction were collected during hospital stay. The reintervention time or follow-up time was considered as the time between the first and the second surgery (calculated in months). In-hospital stay was calculated as the interval between the hospital admission date and the discharge date (calculated in days). Inflammatory reaction was considered as the presence of at least one criterion of the following: rash, itching, groin or buttock pain, heat, hyperemia, swelling and drainage of secretions.

Statistical analysis

The analysis was performed in SPSS version 18 (SPSS Inc., IBM Corporation, Armonk, New York). Quantitative variables were described as mean, standard deviation, median, and interquartile range (IQR). Qualitative variables were described as frequencies. Correlations between variables were analyzed by the Pearson test. The Mann-Whitney test was used to identify age differences between genders. Analysis of variance (ANOVA) was used to identify differences in neoformed bone and lyophilized xenografts in gender groups. Differences in the study were considered significant when the *p* value was <0.05.

Results

Fourteen subjects were included in this study. The characteristics of this population are displayed in Table 1. There were considerably more women than men in our sample. The mean±standard deviation age at the time of reintervention was 61±16 years (median 60, IQR 52–77) for women and 37±12 years (median 43, IQR 25–47) for men ($p=0.007$). The mean±standard error time between the first total hip arthroplasty revision, in which the xenograft was used, and the second revision, in which the biopsy was done, was 70.07±13.94 months (median 62, IQR 42.75–97.4). No correlation between the amount of neoformed bone and the time between the first and second revisions was found ($p=0.317$ and $r=0.288$).

Results of Histological Analysis

A homogeneous histological pattern was found among the glass slides when analyzed by the Pathologist. All samples presented fibrous tissue, neoformed bone, and partially reabsorbed lyophilized xenograft (Figure 1).

The average proportion of neoformed bone in the samples was 61.79±22.49% (mean±standard); the average proportion of lyophilized xenograft was 38.21±22.5%. This result demonstrated that bovine xenograft absorption increased with the amount of neoformed bone. Twelve samples showed bone neoformation and two did not show bone neoformation (less than 30% of neoformed bone in the total matrix). The correlation between neoformed bone and lyophilized xenograft was analyzed by the Pearson correlation ($p=0.001$ and $r=-1.00$). It suggested a strong inverse correlation between the variables, indicating that when one increased, the other tended to decrease.

Only two samples did not show bone neoformation. However, they showed the maintenance of large amounts of xenograft and a small amount of neoformed bone (Figure 2). Only one subject presented neutrophils, and only a small proportion of neutrophils, which indicated that there was no inflammatory response to the lyophilized xenograft. This finding correlated with the clinical status of the patient (no clinical sign of infection or reaction in this patient).

Table 1 - Characteristics

Mean (SD) Age (years)	52.36 (18.55)
Gender (n, %)	
Male	5 (35.7)
Female	9 (64.3)
In-hospital Stay (days) [mean (SD), median (IQR)]	12.21 (9.06), 10 (7–14)
Reintervention Time (months) [mean (SD), median (IQR)]	63.5 (45.84), 60.5 (18.25–90.25)
Lyophilized Xenograft Absorption (n, %)	
Yes	12 (85.7)
No	2 (14.3)
Lyophilized Xenograft (%) [mean (SD), median (IQR)]	38.21 (22.5), 35.5 (21–50.25)
Neoformed Bone (n, %)	
Yes	12 (85.7)
No	2 (14.3)
Neoformed Bone (%) [mean (SD), median (IQR)]	61.79 (22.49), 64.5 (49.75–79)
Fibrosis (n, %)	
Yes	14 (100)
No	-
Inflammation – Neutrophils (n, %)	
Yes	1 (7.1)
No	13 (92.9)

SD= Standard deviation

IQR= Interquartile range

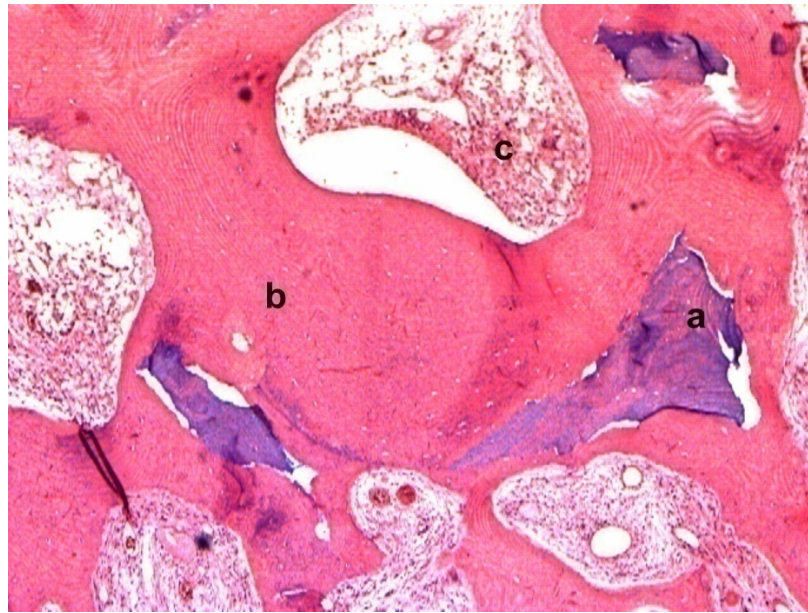


Figure 1 – A biopsy slide of a transversely cut in a thickness of 200 μm at 100x of magnification showing the lyophilized xenograft (blue) and the neoformed bone (pink). **a)** Lyophilized bovine xenograft; **b)** New bone; **c)** Fibrous tissue.

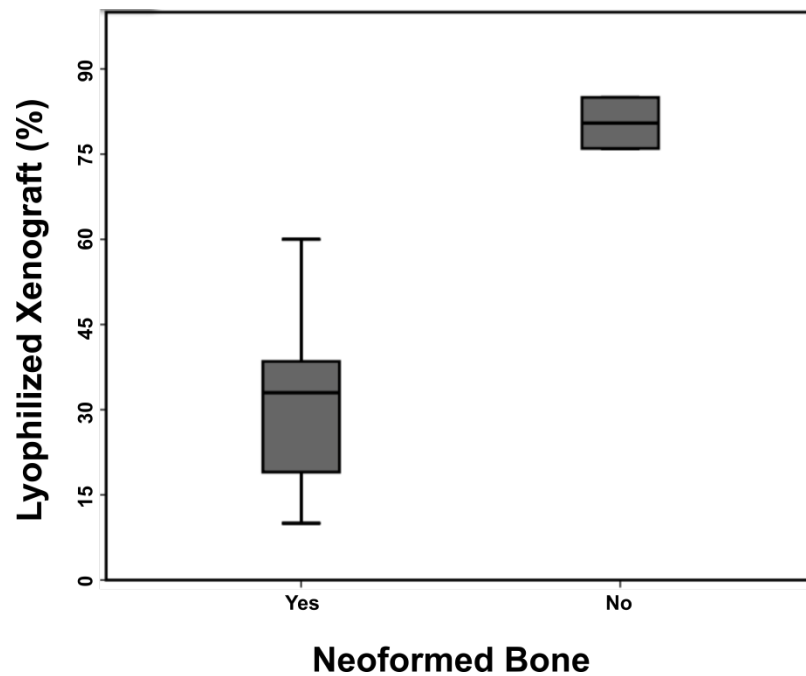


Figure 2 – Distribution showing the maximum and minimum proportions and interquartile range of lyophilized xenograft as well as the mean in presence or absence of neoformation.

Discussion

Autologous bone grafts are considered the “gold standard”^{1,6,10}. They are superior concerning the presence of the three properties (osteoconductive, osteoinductive and the presence of osteoblasts) and the lack of disease transmission and development of immunogenicity⁶. Nevertheless, there are several complications, such as the limit of supply of autologous bone, donor-site morbidity, infection, hematoma, and bleeding^{1,6,10,12-14}.

Allografts are an alternative and consist of within-species (allogenic) bone transplantation¹⁵. The demand for this sort of graft tends to increase¹⁶, but the current supply is small¹⁰. In our country (Brazil) the difficulty to create and maintain a tissue bank, especially a bone bank, makes them so insufficient in number to supply the required demand for grafts. As even in our hospital existing a bone bank, the proportion of tissue donors in relation to the proportion of people who require the use of grafts is extremely lower. Which makes the offer of allograft or bulk allografts lower than the provision of lyophilized bovine bone produced on a large scale. Another factor is that allograft presents an increased risk of disease transmission and tumors^{2,4,16-18}. Some studies have shown that this type of graft can induce host immune responses^{6,15,19,20}. This situation could represent a potential problem in clinical practice^{6,10}.

Xenografts are considered bone transplantation across species and bovine grafts are an example. They have almost unlimited availability and great physical and chemical similarity to human bone^{21,22} being an osteoconductive graft. This state is undeniable and was confirmed by the presence of a substantial proportion of new bone on the glass slides, which would not be possible without the presence of a compatible and good scaffold or trellis^{6,10}.

The adequate scaffold or trellis supports the ingrowth of the new bone regenerated by the local osseous tissue^{6,10}. However one disadvantage of the xenografts is that it may trigger an unwanted immunological and inflammatory host reaction²¹. However, many efforts were made to minimize risks and decrease antigenicity^{1,23}, such as the freeze-drying (lyophilization) process, as used in the present study. These improvements make xenografts a good choice for the treatment of bony loss^{21,22}, and some studies demonstrated their use in humans^{1,22-26} and animals²⁷. No study has shown an association between lyophilized xenografts and the presence of reaction or infection^{24,26}, as well as the association between the use of this kind of graft and the bovine spongiform encephalopathy disease (BSE) and its new variant the Creutzfeldt-Jakob disease (CJD). The secure use of this graft in relation to the CJD becomes possible because the lyophilization process chemically inactivates most of the bacterial agents, viral agents and prionic (prions) agents to a safe limit to the use in humans^{22,28,29}, making the bovine graft safe for use in humans. Xenografts are an excellent graft option, considering the good clinical outcomes, consolidation, absence of pain, and absence of antigenic reaction^{22,23,25}. However, all of these studies²²⁻²⁶ with positive results evaluated only clinical and radiological findings. Only one article¹ has shown a good outcome when analyzing biopsy results. Our study is the second in the literature in analyze biopsies in xenograft bone transplantation.

Meyer *et al.*¹, comparing the biopsies of two procedures with autologous grafts versus seven with Tutobone[®] (bovine xenograft) during 11 months of follow-up, demonstrated that the proportions of remnants of xenograft and new bone formation were 47% and 53%, respectively. Our study, which had double the number of subjects and a longer mean follow-up of 63.5 months, demonstrated 38.21% of remnant xenograft and 61.79% of neoformed bone. An explanation to the superior results in the analyses could be that our lyophilization process modified in a few phases the Kakiuchi *et al.*³⁰ process used by Meyer *et al.*¹. Another

explanation for the higher new bone formation in our results was the long follow-up time. However, this is controversial. Instinctively, we would expect greater bone neoformation with a longer follow-up; however, statistically this correlation was not confirmed. Our case series demonstrates that when lyophilized bone is absorbed, new bone is formed.

Two samples showed low rates of new bone formation, indicating low osteoblastic activity near the xenograft. The proportions of neoformed bone/xenograft in the total mineralized matrix in these two samples were 15%/85% and 24%/76%. These findings demonstrate low bone turnover at the biopsy site and invite us to reflect on the factor that may have affected bone neoformation in these patients. This factor may be biological or mechanical and may influence local osseous repair. It is important and interesting to note that one of these two patients had McCune-Albright syndrome. One of the three major features of this disease that can affect bone metabolism is polyostotic fibrous dysplasia; as the patients also have hormonal dysfunctions such as hyperparathyroidism and hyperthyroidism³¹. Another fact is that these two patients were the only smokers in the series of 14 patients. We believe that the changes caused by smoking can lead to an unfavorable outcome in new bone formation. Even though the two patients did not present good rates of new bone formation, they did not have any clinical complaints of pain or disability or radiological signs of the presence of radiolucent areas or lack of consolidation.

The use of bone allografts to restore bone defects in acetabular reconstruction became a feasible reality and was reported and popularized by Slooff *et al.*³². Several authors demonstrated survival rates of 90.8% at 35.8 months^{33,34}, 95% at 51 months³⁵, and 94% at 11.8 years³⁶. However, the assessment of graft integration in these cases is quite complex, even when there are proposed criteria³⁷ to evaluate radiograph graft integration. Only a biopsy can demonstrate real incorporation³⁸, and our study is one of the few studies to demonstrate biopsy results for bovine lyophilized xenografts.

Our study has several limitations. The site where the biopsies were collected may have been in a local area with a large or small amount of xenograft/neoformed bone. Thus, it may not have reflected the global reality of patients. In addition, we did not evaluate how much graft was used in the first revision surgery. Despite these limitations, the present study has a longer follow-up time and a greater number of subjects compared with the only other study¹ analyzing biopsies in clinical cases of xenografts.

In conclusion, the use of lyophilized xenografts is safe due to the absence of inflammatory response until the present moment and the absence of donor site morbidity. In addition, lyophilized xenografts can be used for the largest bone loss not dependent on the donor site as autologous grafts. They can be produced on a large scale, have mainly good clinical outcomes, and have shown satisfactory histological results.

References

1. Meyer S, Floerkemeier T, Windhagen H. Histological osseointegration of Tutobone: first results in human. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. Jun 2008;128(6):539-544.
2. Sugihara S, van Ginkel AD, Jiya TU, van Royen BJ, van Diest PJ, Wuisman PI. Histopathology of retrieved allografts of the femoral head. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. Mar 1999;81(2):336-341.
3. Slooff TJ, Buma P, Schreurs BW, Schimmel JW, Huiskes R, Gardeniers J. Acetabular and femoral reconstruction with impacted graft and cement. *Clinical orthopaedics and related research*. Mar 1996(324):108-115.
4. Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Camargo LM, Marinho DR, Moreira LF. Femoral and acetabular revision using impacted nondemineralized freeze-dried bone allografts. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association*. May 2009;14(3):259-265.
5. Buckup J, Salinas EA, Valle AG, Boettner F. Treatment of large acetabular defects: a surgical technique utilizing impaction grafting into a metallic mesh. *HSS journal : the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery*. Oct 2013;9(3):242-246.
6. Drosos GI, Kazakos KI, Kouzoumpasis P, Verettas DA. Safety and efficacy of commercially available demineralised bone matrix preparations: a critical review of clinical studies. *Injury*. Sep 2007;38 Suppl 4:S13-21.
7. Williams A, Szabo RM. Bone transplantation. *Orthopedics*. May 2004;27(5):488-495; quiz 496-487.

8. Knaepler H, Laubach S, Gotzen L. [The bone bank--a standardized procedure? Results of a federal survey of German surgical clinics]. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizen*. Nov 1990;61(11):833-836.
9. Campbell DG, Oakeshott RD. Bone allograft banking in South Australia. *The Australian and New Zealand journal of surgery*. Dec 1995;65(12):865-869.
10. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. Mar 2002;84-A(3):454-464.
11. Health NIO. ImageJ Disclaimer. 2004; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. Accessed 01/04/2013, 2013.
12. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clinical orthopaedics and related research*. Aug 1996(329):300-309.
13. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *Journal of orthopaedic trauma*. 1989;3(3):192-195.
14. Schnurer SM, Gopp U, Kuhn KD, Breusch SJ. [Bone substitutes]. *Der Orthopade*. Jan 2003;32(1):2-10.
15. Friedlaender GE. Bone allografts: the biological consequences of immunological events. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. Sep 1991;73(8):1119-1122.
16. Palmer SH, Gibbons CL, Athanasou NA. The pathology of bone allograft. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. Mar 1999;81(2):333-335.
17. 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. *The Journal of arthroplasty*. Feb 2002;17(2):158-164.

18. Heliotis M, Tsiridis EE. Fresh frozen bone in femoral impaction grafting: can developments in bone regeneration improve on this? *Medical hypotheses*. Dec 2001;57(6):675-678.
19. Horowitz MC, Friedlaender GE, Qian HY. The immune response: the efferent arm. *Clinical orthopaedics and related research*. May 1996(326):25-34.
20. Horowitz MC, Friedlaender GE. Immunologic aspects of bone transplantation. A rationale for future studies. *The Orthopedic clinics of North America*. Apr 1987;18(2):227-233.
21. Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Mello TM, Camargo LM, Moreira LF. In vitro and in vivo evaluation of lyophilized bovine bone biocompatibility. *Clinics*. Dec 2008;63(6):801-806.
22. 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*. Aug 2008;63(4):509-514.
23. Morax S, Hurbli T, Smida R. [Bovine heterologous bone graft in orbital surgery]. *Annales de chirurgie plastique et esthetique*. Aug 1993;38(4):445-450.
24. Ledford CK, Nunley JA, 2nd, Viens NA, Lark RK. Bovine xenograft failures in pediatric foot reconstructive surgery. *Journal of pediatric orthopedics*. Jun 2013;33(4):458-463.
25. Maffulli N, Loppini M, Longo UG, Denaro V, Oliva F. Bovine xenograft locking Puddu plate versus tricalcium phosphate spacer non-locking Puddu plate in opening-wedge high tibial osteotomy: a prospective double-cohort study. *International orthopaedics*. May 2013;37(5):819-826.
26. Shibuya N, Jupiter DC, Clawson LD, La Fontaine J. Incorporation of bovine-based structural bone grafts used in reconstructive foot surgery. *The Journal of foot and*

- ankle surgery : official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons*. Jan-Feb 2012;51(1):30-33.
27. Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Mello TM. Uso de enxerto ósseo homólogo e heterólogo em diáfise femural de ratos: comparação entre enxerto ósseo congelado e liofilizado. *Rev Bras Ortop*. 2005;40:141-146.
 28. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials*. Jun 2001;22(12):1599-1606.
 29. Galia CR, Macedo CAdS, Rosito R, Moreira LF. Osteointegração de enxertos liofilizados impactados. *Acta Ortopédica Brasileira*. 2009;17:24-28.
 30. 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. *International orthopaedics*. 1996;20(3):142-146.
 31. Farhat HL, Silva MRDd, Lazaretti-Castro M, Verreschi ITN. Evolução da displasia fibrosa óssea na síndrome de McCune Albright. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*. 1999;43:351-359.
 32. Slooff TJ, Schimmel JW, Buma P. Cemented fixation with bone grafts. *The Orthopedic clinics of North America*. Oct 1993;24(4):667-677.
 33. Buttaro M, Araujo GS, Araujo ES, Comba F, Piccaluga F. Viability of impacted bone allografts under metal mesh at the calcar in revision surgery of the hip. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. Feb 2008;90(2):228-231.
 34. Buttaro MA, Comba F, Pusso R, Piccaluga F. Acetabular revision with metal mesh, impaction bone grafting, and a cemented cup. *Clinical orthopaedics and related research*. Oct 2008;466(10):2482-2490.

35. Comba F, Buttaro M, Pusso R, Piccaluga F. Acetabular reconstruction with impacted bone allografts and cemented acetabular components: a 2- to 13-year follow-up study of 142 aseptic revisions. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. Jul 2006;88(7):865-869.
36. Schreurs BW, Slooff TJ, Buma P, Gardeniers JW, Huiskes R. Acetabular reconstruction with impacted morsellised cancellous bone graft and cement. A 10- to 15-year follow-up of 60 revision arthroplasties. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. May 1998;80(3):391-395.
37. Conn RA, Peterson LFA, Stauffer RN, Ilstrup D. Management of acetabular deficiency; long-term results of bone-grafting the acetabulum in total hip arthroplasty. *Orthop Trans*. 1985;9:451-452.
38. Schreurs BW, Busch VJ, Welten ML, Verdonschot N, Slooff TJ, Gardeniers JW. Acetabular reconstruction with impaction bone-grafting and a cemented cup in patients younger than fifty years old. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. Nov 2004;86-A(11):2385-2392.

REFERÊNCIAS

1. Flugsrud GB, Nordsletten L, Reinholt FP, Risberg MA, Rydevik K, Uhlig T. [Osteoarthritis]. Tidsskrift for den Norske laegeforening : tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke. 2010;130(21):2136-40.
2. IBGE. Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios 2009.: IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística); 2009 [cited 2009 25/02/2009]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/trabalhoerendimento/pnad2009/default.shtm>.
3. Patrizzi LJ, Vilaça KHC, Takata ET, Trigueiro G. Análise pré e pós-operatória da capacidade funcional e qualidade de vida de pacientes portadores de Osteoartrose de quadril submetidos à Artroplastia Total. Revista Brasileira de Reumatologia. 2004;44:185-91.
4. Sharma L, Kapoor D, Issa S. Epidemiology of osteoarthritis: an update. Current opinion in rheumatology. 2006;18(2):147-56.
5. Egloff C, Hugle T, Valderrabano V. Biomechanics and pathomechanisms of osteoarthritis. Swiss medical weekly. 2012;142:w13583.
6. Kalunian KC, Ritter S. Pathogenesis of osteoarthritis: Wolters Kluwer Health; 2013 [cited 2014 07/10/2014]. Available from: www.uptodate.com.

7. Mow VC, Ratcliffe A, Poole AR. Cartilage and diarthrodial joints as paradigms for hierarchical materials and structures. *Biomaterials*. 1992;13(2):67-97.
8. Recommendations for the medical management of osteoarthritis of the hip and knee: 2000 update. *Arthritis & Rheumatism*. 2000;43(9):1905-15.
9. Wood AM, Brock TM, Heil K, Holmes R, Weusten A. A Review on the Management of Hip and Knee Osteoarthritis. *International Journal of Chronic Diseases*. 2013;2013:10.
10. Jones CA, Voaklander DC, Johnston DW, Suarez-Almazor ME. Health related quality of life outcomes after total hip and knee arthroplasties in a community based population. *The Journal of rheumatology*. 2000;27(7):1745-52.
11. Laupacis A, Bourne R, Rorabeck C, Feeny D, Wong C, Tugwell P, et al. The effect of elective total hip replacement on health-related quality of life. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1993;75(11):1619-26.
12. Gill PS, Paprosky WG. Failed Hip Arthroplasty: Revision and Arthrodesis. In: Chapman MW, editor. *Chapman's Orthopaedic Surgery*. 1. 3 ed: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 2796-858.
13. Mulroy WF, Estok DM, Harris WH. Total hip arthroplasty with use of so-called second-generation cementing techniques. A fifteen-year-average follow-up study. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1995;77(12):1845-52.

14. Cuckler JM. Management strategies for acetabular defects in revision total hip arthroplasty. *The Journal of arthroplasty*. 2002;17(4 Suppl 1):153-6.
15. Gross AE. Restoration of acetabular bone loss 2005. *The Journal of arthroplasty*. 2006;21(4 Suppl 1):117-20.
16. Haddad FS, Garbuz DS, Masri BA, Duncan CP, Hutchison CR, Gross AE. Instructional course lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons-femoral bone loss in patients managed with revision hip replacement: results of circumferential allograft replacement. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1999;81:420-36.
17. Paprosky WG, Magnus RE. Principles of bone grafting in revision total hip arthroplasty. Acetabular technique. *Clinical orthopaedics and related research*. 1994(298):147-55.
18. Gie GA, Linder L, Ling RS, Simon JP, Slooff TJ, Timperley AJ. Impacted cancellous allografts and cement for revision total hip arthroplasty. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1993;75(1):14-21.
19. Pak JH, Paprosky WG, Jablonsky WS, Lawrence JM. Femoral strut allografts in cementless revision total hip arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research*. 1993(295):172-8.
20. Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Camargo LM, Marinho DR, Moreira LF. Femoral and acetabular revision using impacted nondemineralized freeze-dried bone allografts.

- Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association. 2009;14(3):259-65.
21. Campbell DG, Oakeshott RD. Bone allograft banking in South Australia. The Australian and New Zealand journal of surgery. 1995;65(12):865-9.
 22. Knaepler H, Laubach S, Gotzen L. [The bone bank--a standardized procedure? Results of a federal survey of German surgical clinics]. Der Chirurg; Zeitschrift fur alle Gebiete der operativen Medizen. 1990;61(11):833-6.
 23. Williams A, Szabo RM. Bone transplantation. Orthopedics. 2004;27(5):488-95; quiz 96-7.
 24. Palmer SH, Gibbons CL, Athanasou NA. The pathology of bone allograft. The Journal of bone and joint surgery British volume. 1999;81(2):333-5.
 25. Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. The Journal of bone and joint surgery American volume. 2002;84-A(3):454-64.
 26. Ribeiro TA, Coussirat C, Pagnussato F, Diesel CV, Macedo FC, Macedo CA, et al. Lyophilized xenograft: a case series of histological analysis of biopsies. Cell and tissue banking. 2014.
 27. Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Mello TM, Camargo LM, Moreira LF. In vitro and in vivo evaluation of lyophilized bovine bone biocompatibility. Clinics. 2008;63(6):801-6.

28. 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*. 2008;63(4):509-14.
29. Maffulli N, Loppini M, Longo UG, Denaro V, Oliva F. Bovine xenograft locking Puddu plate versus tricalcium phosphate spacer non-locking Puddu plate in opening-wedge high tibial osteotomy: a prospective double-cohort study. *International orthopaedics*. 2013;37(5):819-26.
30. Morax S, Hurbli T, Smida R. [Bovine heterologous bone graft in orbital surgery]. *Annales de chirurgie plastique et esthetique*. 1993;38(4):445-50.
31. Schreurs BW, Busch VJ, Welten ML, Verdonschot N, Slooff TJ, Gardeniers JW. Acetabular reconstruction with impaction bone-grafting and a cemented cup in patients younger than fifty years old. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2004;86-A(11):2385-92.
32. Duarte YAdO. O processo de envelhecimento e a assistência ao idoso. In: Saúde IpoDd, Paulo UdS, Saúde Md, Telefônica F, editors. *Manual de Enfermagem*. São Paulo: Ministério da Saúde; 2001. p. 185 - 96.
33. Kalunian KC. *Diagnosis and classification of osteoarthritis*: Wolters Kluwer Health; 2013 [cited 2014 18/09/2014]. Available from: www.uptodate.com.
34. Alviar MJ, Olver J, Brand C, Hale T, Khan F. Do patient-reported outcome measures used in assessing outcomes in rehabilitation after hip and knee arthroplasty capture

- issues relevant to patients? Results of a systematic review and ICF linking process. *Journal of rehabilitation medicine : official journal of the UEMS European Board of Physical and Rehabilitation Medicine*. 2011;43(5):374-81.
35. Chodosh J, Morton SC, Mojica W, Maglione M, Suttorp MJ, Hilton L, et al. Meta-analysis: chronic disease self-management programs for older adults. *Annals of internal medicine*. 2005;143(6):427-38.
 36. Bijlsma JW, Berenbaum F, Lafeber FP. Osteoarthritis: an update with relevance for clinical practice. *Lancet*. 2011;377(9783):2115-26.
 37. Felson DT, Lawrence RC, Dieppe PA, Hirsch R, Helmick CG, Jordan JM, et al. Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors. *Annals of internal medicine*. 2000;133(8):635-46.
 38. Felson DT, Zhang Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis and rheumatism*. 1998;41(8):1343-55.
 39. Schwartzmann CR, Boschin LC. Quadril do Adulto. In: Hebert S, Filho TEPdB, Xavier R, Jr. AGP, editors. *Ortopedia e Traumatologia: Princípios e Prática*. 4 ed. Porto Alegre: Artmed Editora S. A.; 2009. p. 407-42.
 40. Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Howell DS. Etiopathogenesis of osteoarthritis. In: Koopman WJ, editor. *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*. 13 ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997. p. 1969.

41. Felson DT. Risk factors for osteoarthritis: understanding joint vulnerability. *Clinical orthopaedics and related research*. 2004(427 Suppl):S16-21.
42. Abramson SB, Attur M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis research & therapy*. 2009;11(3):227.
43. Kellgren JH, Lawrence JS, Bier F. Genetic Factors in Generalized Osteo-Arthrosis. *Annals of the rheumatic diseases*. 1963;22:237-55.
44. Zhai G, Hart DJ, Kato BS, MacGregor A, Spector TD. Genetic influence on the progression of radiographic knee osteoarthritis: a longitudinal twin study. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2007;15(2):222-5.
45. Valdes AM, Doherty M, Spector TD. The additive effect of individual genes in predicting risk of knee osteoarthritis. *Annals of the rheumatic diseases*. 2008;67(1):124-7.
46. Cooper C, Inskip H, Croft P, Campbell L, Smith G, McLaren M, et al. Individual risk factors for hip osteoarthritis: obesity, hip injury, and physical activity. *American journal of epidemiology*. 1998;147(6):516-22.
47. Bobacz K, Erlacher L, Smolen J, Soleiman A, Graninger WB. Chondrocyte number and proteoglycan synthesis in the aging and osteoarthritic human articular cartilage. *Annals of the rheumatic diseases*. 2004;63(12):1618-22.

48. Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2009;17(8):971-9.
49. Robertson CM, Pennock AT, Harwood FL, Pomerleau AC, Allen RT, Amiel D. Characterization of pro-apoptotic and matrix-degradative gene expression following induction of osteoarthritis in mature and aged rabbits. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2006;14(5):471-6.
50. Todd Allen R, Robertson CM, Harwood FL, Sasho T, Williams SK, Pomerleau AC, et al. Characterization of mature vs aged rabbit articular cartilage: analysis of cell density, apoptosis-related gene expression and mechanisms controlling chondrocyte apoptosis. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2004;12(11):917-23.
51. Rosner IA, Goldberg VM, Moskowitz RW. Estrogens and osteoarthritis. *Clinical orthopaedics and related research*. 1986(213):77-83.
52. Spector TD, Campion GD. Generalised osteoarthritis: a hormonally mediated disease. *Annals of the rheumatic diseases*. 1989;48(6):523-7.
53. Nevitt MC, Cummings SR, Lane NE, Hochberg MC, Scott JC, Pressman AR, et al. Association of estrogen replacement therapy with the risk of osteoarthritis of the hip in elderly white women. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Archives of internal medicine*. 1996;156(18):2073-80.

54. Sniekers YH, Weinans H, Bierma-Zeinstra SM, van Leeuwen JP, van Osch GJ. Animal models for osteoarthritis: the effect of ovariectomy and estrogen treatment - a systematic approach. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2008;16(5):533-41.
55. Nevitt MC, Felson DT, Williams EN, Grady D. The effect of estrogen plus progestin on knee symptoms and related disability in postmenopausal women: The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study, a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis and rheumatism*. 2001;44(4):811-8.
56. Bullough PG. The geometry of diarthrodial joints, its physiologic maintenance, and the possible significance of age-related changes in geometry-to-load distribution and the development of osteoarthritis. *Clinical orthopaedics and related research*. 1981(156):61-6.
57. Nicolaidis AN, Fernandes e Fernandes J, Pollock AV. Intermittent sequential pneumatic compression of the legs in the prevention of venous stasis and postoperative deep venous thrombosis. *Surgery*. 1980;87(1):69-76.
58. Kalunian KC. *Nonpharmacologic therapy of osteoarthritis*: Wolters Kluwer Health; 2013 [cited 2014 16/09/2014]. Available from: www.uptodate.com.
59. Towheed T, Shea B, Wells G, Hochberg M. Analgesia and non-aspirin, non-steroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis of the hip. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2000(2):CD000517.

60. Clegg DO, Reda DJ, Harris CL, Klein MA, O'Dell JR, Hooper MM, et al. Glucosamine, chondroitin sulfate, and the two in combination for painful knee osteoarthritis. *The New England journal of medicine*. 2006;354(8):795-808.
61. Caiafa JS. Medidas profiláticas da doença tromboembólica. In: Thomás JB, editor. *Síndromes venosas: diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro: Revinter; 2001.
62. Millis MB, Poss R, Murphy SB. Osteotomies of the hip in the prevention and treatment of osteoarthritis. *Instructional course lectures*. 1992;41:145-54.
63. Beck M, Kalhor M, Leunig M, Ganz R. Hip morphology influences the pattern of damage to the acetabular cartilage: femoroacetabular impingement as a cause of early osteoarthritis of the hip. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2005;87(7):1012-8.
64. Beck M, Leunig M, Parvizi J, Boutier V, Wyss D, Ganz R. Anterior femoroacetabular impingement: part II. Midterm results of surgical treatment. *Clinical orthopaedics and related research*. 2004(418):67-73.
65. Boone G, Pagnotto MR, Walker JA, Trousdale RT, Sierra RJ. Radiographic features associated with differing impinging hip morphologies with special attention to coxa profunda. *Clinical orthopaedics and related research*. 2012;470(12):3368-74.
66. Eijer H, Myers SR, Ganz R. Anterior femoroacetabular impingement after femoral neck fractures. *Journal of orthopaedic trauma*. 2001;15(7):475-81.

67. Ganz R, Parvizi J, Beck M, Leunig M, Notzli H, Siebenrock KA. Femoroacetabular impingement: a cause for osteoarthritis of the hip. *Clinical orthopaedics and related research*. 2003(417):112-20.
68. Ito K, Minka MA, 2nd, Leunig M, Werlen S, Ganz R. Femoroacetabular impingement and the cam-effect. A MRI-based quantitative anatomical study of the femoral head-neck offset. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2001;83(2):171-6.
69. Leunig M, Casillas MM, Hamlet M, Hersche O, Notzli H, Slongo T, et al. Slipped capital femoral epiphysis: early mechanical damage to the acetabular cartilage by a prominent femoral metaphysis. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 2000;71(4):370-5.
70. Myers SR, Eijer H, Ganz R. Anterior femoroacetabular impingement after periacetabular osteotomy. *Clinical orthopaedics and related research*. 1999(363):93-9.
71. Notzli HP, Wyss TF, Stoecklin CH, Schmid MR, Treiber K, Hodler J. The contour of the femoral head-neck junction as a predictor for the risk of anterior impingement. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2002;84(4):556-60.
72. Della Valle CJ, Rosenberg AG. Primary Total Hip Arthroplasty: Indications and Contraindications. In: Callaghan JJ, Rosenberg AG, Rubash HE, editors. *The Adult Hip*. 2. 2 ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 851-8.
73. Gluck T. Die Invaginationsmethode der Osteo-und Arthroplastik. *Berl Klin Wochenschr*. 1890;28:732-6, 52-57.

74. Haas J. Neue Anwendungsgebiete der Lorenz'schen Bifurkation (Gabelung des oberen Femurendes). *Zentralbl Chir.* 1927;54:783-5.
75. Waugh W. *John Charnley: The Man and The Hip.* London: Springer-Verlag; 1990.
76. Charnley J. Total hip replacement by low-friction arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research.* 1970;72:7-21.
77. Charnley J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *The Journal of bone and joint surgery British volume.* 1960;42-B:28-30.
78. Berry DJ. Primary Total Hip Arthroplasty. In: Chapman MW, editor. *Chapman's Orthopaedic Surgery.* 1. 3 ed: Lippincott Williams & Wilkins 2001. p. 2770-94.
79. Haddad FS, Masri BA, Garbuz DS, Duncan CP. The treatment of the infected hip replacement. The complex case. *Clinical orthopaedics and related research.* 1999(369):144-56.
80. McNamara IR. Impaction bone grafting in revision hip surgery: past, present and future. *Cell and tissue banking.* 2010;11(1):57-73.
81. Amstutz HC, Ma SM, Jinnah RH, Mai L. Revision of aseptic loose total hip arthroplasties. *Clinical orthopaedics and related research.* 1982(170):21-33.

82. Callaghan JJ, Salvati EA, Pellicci PM, Wilson PD, Jr., Ranawat CS. Results of revision for mechanical failure after cemented total hip replacement, 1979 to 1982. A two to five-year follow-up. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1985;67(7):1074-85.
83. Collis DK. Revision total hip replacement with cement. *Seminars in arthroplasty*. 1993;4(1):38-49.
84. Pellicci PM, Wilson PD, Jr., Sledge CB, Salvati EA, Ranawat CS, Poss R, et al. Long-term results of revision total hip replacement. A follow-up report. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1985;67(4):513-6.
85. Engh CA, Bobyn JD, Glassman AH. Porous-coated hip replacement. The factors governing bone ingrowth, stress shielding, and clinical results. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1987;69(1):45-55.
86. Engh CA, Glassman AH, Griffin WL, Mayer JG. Results of cementless revision for failed cemented total hip arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research*. 1988(235):91-110.
87. Cabral FP, Rinaldi E, Silveira SCd, Rabello BT. Total hip revision arthroplasty with the Wagner femoral component. *Revista do INTO*. 2003;1(1):5-8.
88. Morsi E, Garbuz D, Gross AE. Revision total hip arthroplasty with shelf bulk allografts. A long-term follow-up study. *The Journal of arthroplasty*. 1996;11(1):86-90.

89. Morsi E, Garbuz D, Gross AE. Total hip arthroplasty with shelf grafts using uncemented cups. A long-term follow-up study. *The Journal of arthroplasty*. 1996;11(1):81-5.
90. Palm L, Jacobsson SA, Kvist J, Lindholm A, Ojersjo A, Ivarsson I. Acetabular revision with extensive allograft impaction and uncemented hydroxyapatite-coated implants. Results after 9 (7-11) years follow-up. *The Journal of arthroplasty*. 2007;22(8):1083-91.
91. Zehntner MK, Ganz R. Midterm results (5.5-10 years) of acetabular allograft reconstruction with the acetabular reinforcement ring during total hip revision. *The Journal of arthroplasty*. 1994;9(5):469-79.
92. Jasty M. Jumbo cups and morsalized graft. *The Orthopedic clinics of North America*. 1998;29(2):249-54.
93. Sporer SM, Paprosky WG, O'Rourke MR. Managing bone loss in acetabular revision. *Instructional course lectures*. 2006;55:287-97.
94. Abolghasemian M, Tangsataporn S, Sternheim A, Backstein D, Safir O, Gross AE. Combined trabecular metal acetabular shell and augment for acetabular revision with substantial bone loss: a mid-term review. *The bone & joint journal*. 2013;95-B(2):166-72.
95. Davies JH, Laflamme GY, Delisle J, Fernandes J. Trabecular metal used for major bone loss in acetabular hip revision. *The Journal of arthroplasty*. 2011;26(8):1245-50.

96. Sternheim A, Backstein D, Kuzyk PR, Goshua G, Berkovich Y, Safir O, et al. Porous metal revision shells for management of contained acetabular bone defects at a mean follow-up of six years: a comparison between up to 50% bleeding host bone contact and more than 50% contact. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2012;94(2):158-62.
97. Gehrke T, Bangert Y, Schwantes B, Gebauer M, Kendoff D. Acetabular revision in THA using tantalum augments combined with impaction bone grafting. *Hip international : the journal of clinical and experimental research on hip pathology and therapy*. 2013;23(4):359-65.
98. Sugihara S, van Ginkel AD, Jiya TU, van Royen BJ, van Diest PJ, Wuisman PI. Histopathology of retrieved allografts of the femoral head. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1999;81(2):336-41.
99. Galia CR, Moreira LF. The Biology of Bone Grafts. In: Fokter S, editor. *Recent Advances in Arthroplasty*: InTech; 2012. p. 235-54.
100. Meyer S, Floerkemeier T, Windhagen H. Histological osseointegration of Tutobone: first results in human. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2008;128(6):539-44.
101. Slooff TJ, Buma P, Schreurs BW, Schimmel JW, Huiskes R, Gardeniers J. Acetabular and femoral reconstruction with impacted graft and cement. *Clinical orthopaedics and related research*. 1996(324):108-15.

102. Buckup J, Salinas EA, Valle AG, Boettner F. Treatment of large acetabular defects: a surgical technique utilizing impaction grafting into a metallic mesh. *HSS journal : the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery*. 2013;9(3):242-6.
103. Drosos GI, Kazakos KI, Kouzoumpasis P, Verettas DA. Safety and efficacy of commercially available demineralised bone matrix preparations: a critical review of clinical studies. *Injury*. 2007;38 Suppl 4:S13-21.
104. Barth H. Histologische untersuchungen uber knochen-transplantation. *Beitr Pathol Anat Allg Path*. 1895;17:65-142 (in German).
105. Arrington ED, Smith WJ, Chambers HG, Bucknell AL, Davino NA. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clinical orthopaedics and related research*. 1996(329):300-9.
106. Schnurer SM, Gopp U, Kuhn KD, Breusch SJ. [Bone substitutes]. *Der Orthopade*. 2003;32(1):2-10.
107. Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *Journal of orthopaedic trauma*. 1989;3(3):192-5.
108. Friedlaender GE. Bone allografts: the biological consequences of immunological events. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1991;73(8):1119-22.

109. Heliotis M, Tsiridis EE. Fresh frozen bone in femoral impaction grafting: can developments in bone regeneration improve on this? Medical hypotheses. 2001;57(6):675-8.
110. 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. The Journal of arthroplasty. 2002;17(2):158-64.
111. Horowitz MC, Friedlaender GE. Immunologic aspects of bone transplantation. A rationale for future studies. The Orthopedic clinics of North America. 1987;18(2):227-33.
112. Horowitz MC, Friedlaender GE, Qian HY. The immune response: the efferent arm. Clinical orthopaedics and related research. 1996(326):25-34.
113. Ledford CK, Nunley JA, 2nd, Viens NA, Lark RK. Bovine xenograft failures in pediatric foot reconstructive surgery. Journal of pediatric orthopedics. 2013;33(4):458-63.
114. Shibuya N, Jupiter DC, Clawson LD, La Fontaine J. Incorporation of bovine-based structural bone grafts used in reconstructive foot surgery. The Journal of foot and ankle surgery : official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons. 2012;51(1):30-3.

115. Galia CR, Macedo CA, Rosito R, Mello TM. Uso de enxerto ósseo homólogo e heterólogo em diáfise femural de ratos: comparação entre enxerto ósseo congelado e liofilizado. *Rev Bras Ortop.* 2005;40:141-6.
116. Galia CR, Macedo CAdS, Rosito R, Mello TMd, Diesel C, Moreira LF. Caracterização físico-química de ossos liofilizados de origem bovina e humana. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões.* 2009;36:157-60.
117. Galia CR, Macedo CAdS, Rosito R, Moreira LF. Osteointegração de enxertos liofilizados impactados. *Acta Ortopédica Brasileira.* 2009;17:24-8.
118. Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials.* 2001;22(12):1599-606.
119. Brostrom LA, Nilsson U, Nilsson OS. Survival of frozen bone allograft. *Annales chirurgiae et gynaecologiae.* 1988;77(2):85-9.
120. Parrish FF. Allograft replacement of all or part of the end of a long bone following excision of a tumor. *The Journal of bone and joint surgery American volume.* 1973;55(1):1-22.
121. Gouin F, Passuti N, Verrielle V, Delecrin J, Bainvel JV. Histological features of large bone allografts. *The Journal of bone and joint surgery British volume.* 1996;78(1):38-41.

122. Enneking WF, Campanacci DA. Retrieved human allografts : a clinicopathological study. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2001;83-A(7):971-86.
123. Hamadouche M, Blanchat C, Meunier A, Kerboull L, Kerboull M. Histological findings in a proximal femoral structural allograft ten years following revision total hip arthroplasty: a case report. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2002;84-A(2):269-73.
124. Hirose I, Kawauchi K, Kondo S, Tashiro I, Kusaba A, Itoh Y, et al. Histological evaluation of allograft bone after acetabular revision arthroplasty: report of two cases. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association*. 2000;5(5):515-9.
125. Schreurs BW, Buma P. Impaction bone grafting. *Acta orthopaedica Scandinavica*. 2001;72(6):661-3.
126. Health NIo. ImageJ Disclaimer 2004 [updated 17/11/2004; cited 2013 01/04/2013]. Available from: <http://rsb.info.nih.gov/ij/>.

CONCLUSÃO

A presença de neoformação óssea foi confirmada através do estudo pela análise histológica das amostras. A neoformação ocorreu em todas as 14 amostras, e foi considerada satisfatória, de acordo com os critérios estabelecidos neste estudo, na grande maioria das amostras, ou seja, em 85,7%.

Foi evidenciada a correlação entre a absorção do EBL e a neoformação óssea, ou seja, este estudo evidenciou que à medida que o EBL é absorvido a neoformação óssea vai progredindo (aumentando).

Não se evidenciou correlação entre o tempo de reintervenção (*follow-up*) e a neoformação óssea.

Foi observada a existência de diferença de idade entre os gêneros, sendo o gênero feminino mais velho. Também se observou que o gênero feminino teve uma maior permanência hospitalar (tempo de internação) comparado ao masculino.

O enxerto bovino liofilizado é uma alternativa viável e eficaz para reconstrução dos defeitos ósseos, sendo uma importante ferramenta no tratamento dos defeitos ósseos.

ANEXOS

Anexo A – Formulário de preenchimento**COLETA NOS PRONTUÁRIOS E EXAME FÍSICO**

NOME: _____

Nº (identificação única de cada paciente no bando de dados): _____

ENDEREÇO: _____

SEXO: (0) masculino (1) feminino

PRONTUÁRIO: _____ TELEFONE: _____

DATA NASCIMENTO: _____ / _____ / _____

DATA DA PRIMEIRA REVISÃO (ONDE FOI UTILIZADO O ENXERTO BOVINO):
_____ / _____ / _____DATA DA SEGUNDA REVISÃO (QUANDO FOI REALIZADA A BIÓPSIA):
_____ / _____ / _____

SINAIS CLÍNICOS DE INFECÇÃO: (0) Não (1) Sim

SE SIM, QUAIS:

- () Dor na região inguinal () Dor na região glútea
 () *Rash* cutâneo () Hiperemia no local da cirurgia
 () Prurido no local da cirurgia () Edema no local da cirurgia
 () Drenagem de secreção no local da cirurgia (fístula)

TABAGISMO: (0) Não (1) SIM

ETILISMO: (0) Não (1) SIM

HISTÓRICO DE PATOLOGIAS PREGRESSAS:

- () HAS
 () DIABETES
 () CARDIOPATIA, se sim qual: _____
 () AVE, se sim qual: () Hemorrágico () Isquêmico () Transitório
 () DOENÇAS RENAIIS, se sim qual: _____
 () DOENÇA PULMONAR, se sim qual: _____
 () DOENÇA ENDOCRINOLÓGICA, se sim qual: _____

ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS LÂMINAS:

QUADRANTE 1:

Proporção de enxerto bovino liofilizado remanescente: _____

Proporção de tecido ósseo neoformado: _____

Presença de tecido fibrótico: (0) Não (1) Sim

Presença de neutrófilos: (0) Não (1) Sim

Presença de alguma estrutura atípica: (0) Não (1) Sim

QUADRANTE 2:

Proporção de enxerto bovino liofilizado remanescente: _____

Proporção de tecido ósseo neoformado: _____

Presença de tecido fibrótico: (0) Não (1) Sim

Presença de neutrófilos: (0) Não (1) Sim

Presença de alguma estrutura atípica: (0) Não (1) Sim

QUADRANTE 3:

Proporção de enxerto bovino liofilizado remanescente: _____

Proporção de tecido ósseo neoformado: _____

Presença de tecido fibrótico: (0) Não (1) Sim

Presença de neutrófilos: (0) Não (1) Sim

Presença de alguma estrutura atípica: (0) Não (1) Sim

QUADRANTE 4:

Proporção de enxerto bovino liofilizado remanescente: _____

Proporção de tecido ósseo neoformado: _____

Presença de tecido fibrótico: (0) Não (1) Sim

Presença de neutrófilos: (0) Não (1) Sim

Presença de alguma estrutura atípica: (0) Não (1) Sim

Anexo B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas
Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA



O Sr.(a) esta sendo convidado a participar do projeto de pesquisa intitulado: **“ANÁLISE HISTOLÓGICA DA NEOFORMAÇÃO ÓSSEA EM PACIENTES SUBMETIDOS À ARTROPLASTIA TOTAL DE QUADRIL DE REVISÃO COM USO DE ENXERTO BOVINO LIOFILIZADO”**, que tem por finalidade avaliar, através de observação clínica, aplicação de questionário, exame físico e análise de biópsias, a neoformação óssea (a formação de osso novo) em pacientes que foram previamente submetidos ao procedimento de artroplastia total de quadril de revisão (prótese de quadril de revisão) nas quais foi utilizado o enxerto bovino liofilizado.

O Sr.(a) foi selecionado(a) por ser portador(a) de Artroplastia Total de Quadril (prótese de quadril) que já foi revisada (trocada por outra prótese) e que agora necessita ser revisada novamente (trocada por outra prótese novamente). Como é do seu conhecimento, na primeira revisão (troca de prótese) foi necessário o uso de enxerto bovino liofilizado para refazer o seu estoque ósseo (refazer a falta de osso do seu quadril). Agora nesta segunda revisão (troca) que será feita, gostaríamos de coletar e estudar o enxerto que foi utilizado no Sr.(a) na primeira cirurgia de revisão (troca). Esta, portanto é a finalidade deste nosso estudo.

A sua participação neste projeto não traz riscos adicionais em relação aos riscos que são próprios do tratamento indicado para a sua patologia (seu problema). O material que será coletado no momento de sua segunda revisão (troca de prótese), será coletado por agulha de biópsia, e este material (pedaço de enxerto) será muito pequeno, de uma tamanho de 6mm. Este tamanho de material é o mínimo necessário para podermos fazer o nosso estudo a retirada dele não trará risco adicional para sua cirurgia, assim como não trará risco nenhum

para o sucesso do seu procedimento, ou seja, não afetará em nada o resultado de sua cirurgia. Os riscos aos quais o Sr.(a) está submetido são apenas os riscos próprios de sua cirurgia, conforme já explicados, que são: embolia pulmonar, infecção, lesão de nervos ou artérias, sangramentos com necessidade de hemotransfusão (transfusão de sangue), fratura óssea na hora de colocar a prótese. A nossa equipe utiliza-se de diversos métodos para minimizar (diminuir) estes riscos como: antibióticoprofilaxia (uso de antibióticos apenas para prevenção) e rigoroso controle das técnicas de assepsia (não contaminação da cirurgia, manutenção do ambiente sem bactérias ou microrganismos) para prevenção da infecção, uso de anticoagulação profilática (medicação para evitar que o sangue coagule e forme trombos) e mobilização precoce do paciente para prevenção de complicações tromboembólicas, controle rigoroso do sangramento intra e pós-operatório, além da grande experiência técnica da equipe na realização destes procedimentos.

O Sr.(a) terá que responder um pequeno questionário, o qual poderá no mínimo causar algum desconforto ao Sr.(a), assim como o(a) Sr.(a) será examinado(a) na busca de algum sintoma de inflamação ou infecção. Este exame físico pode ser um pouco desconfortável, porém não será doloroso. Estes dados serão de extrema importância para o nosso estudo.

Todas as informações coletadas neste estudo serão estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores terão acesso aos dados, com o compromisso de utilizá-los apenas para pesquisa. Sua participação é voluntária e o Sr.(a) tem a liberdade de se recusar a continuar participando e retirar seu consentimento (permissão) em qualquer momento da pesquisa, sem qualquer prejuízo à sua relação com a equipe ou à continuidade do seu tratamento nesta instituição. O Sr.(a) será mantido(a) atualizado(a) a respeito dos resultados parciais desta pesquisa, e poderá solicitar informações à equipe através do contato constante neste documento, do qual receberá cópia. Não há qualquer tipo de despesa pessoal para o participante, bem como qualquer forma de compensação pela participação no estudo.

Prof. Dr. CARLOS ROBERTO GALIA
 Pesquisador responsável
 Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Serviço de Ortopedia e Traumatologia
 Ramiro Barcelos, 2350 – Bairro Santa Cecília
 Porto Alegre – Rio Grande do Sul
 CEP 90035-903
 TEL/FAX: (51) 3359-8000 e (51) 3359-8001

Dr. _____
 Pesquisador Colaborador
 Hospital de Clínicas de Porto Alegre – Serviço de Ortopedia e Traumatologia
 Assinatura: _____

Comissão Científica e Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação
 Hospital de Clínicas de Porto Alegre
 Ramiro Barcelos, 2350 – Bairro Santa Cecília
 Porto Alegre – Rio Grande do Sul
 TEL/FAX: (51)3359-7640

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG ou
 n°prontuário _____, abaixo assinado, concordo voluntariamente em participar do estudo acima descrito, como sujeito. Declaro ter sido devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador Dr. CARLOS ROBERTO GALIA dos objetivos da pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios envolvidos em minha participação. Foi-me dada a oportunidade de fazer perguntas e recebi telefones para entrar em contato, caso tenha dúvidas. Foi-me garantido que não sou obrigado a participar da pesquisa e posso desistir a qualquer momento, sem qualquer penalidade ou prejuízo ao tratamento. Recebi uma cópia deste documento que é constituído de três folhas.

Porto alegre _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito ou responsável legal: _____

Anexo C – Termo de confidencialidade (TC)

Título do projeto: Análise Histológica da Neoformação Óssea em Pacientes Submetidos à Artroplastia Total de Quadril de Revisão com o Uso de Enxerto Bovino Liofilizado

Pesquisador responsável: Tiango Aguiar Ribeiro, Carlos Roberto Galia

Instituição/Departamento: Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Telefone para contato: (55) 91275091 (Discente Pós-Graduação: Tiango Aguiar Ribeiro)

Local da coleta de dados: Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos pacientes cujos dados serão coletados *em prontuários, lâminas histológicas, em entrevistas e exames físicos com os pacientes pertencentes ao Serviço de Ortopedia e Traumatologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)*. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas na *sala de reuniões do Banco de Multitecidos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre* por um período de *cinco anos* sob a responsabilidade do Pós-Graduando Tiango Aguiar Ribeiro. Este projeto de pesquisa, registrado sob o número 100535, foi revisado e aprovado pela Comissão Científica e Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação, que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/Ministério da Saúde (MS) e pelo *Office for Human Research Protections (OHRP)/USDHHS com Institutional Review Board n°IRB00000921*.

CARLOS ROBERTO GALIA
CPF: 381.659.960-53

TIANGO AGUIAR RIBEIRO
CPF: 822.116.800-97

APÊNDICES

Apêndice A – Gráficos

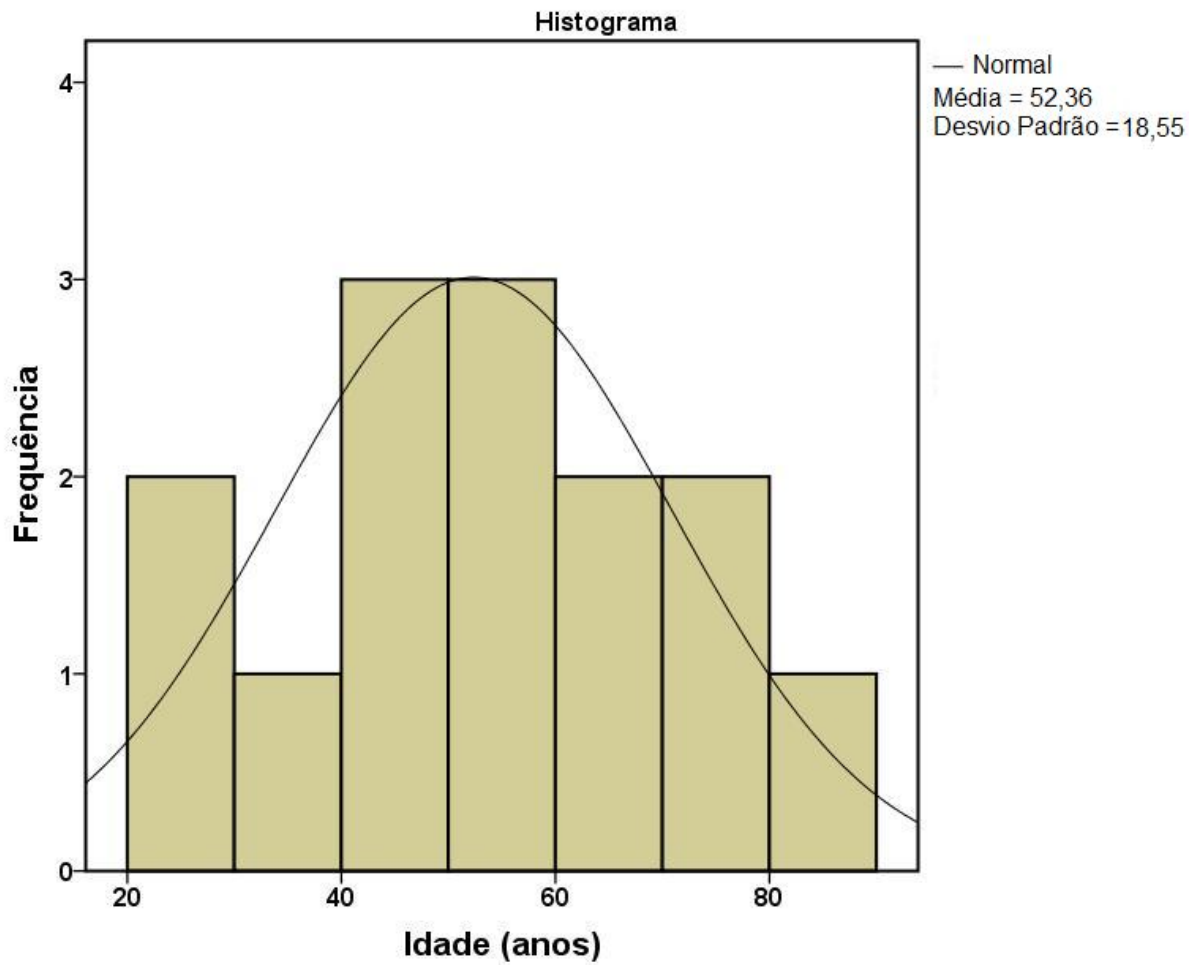


Gráfico 1 – Histograma da idade

Teste de Kolmogorov-Smirnov confirmando a normalidade da variável idade no estudo ($p=0,200$)

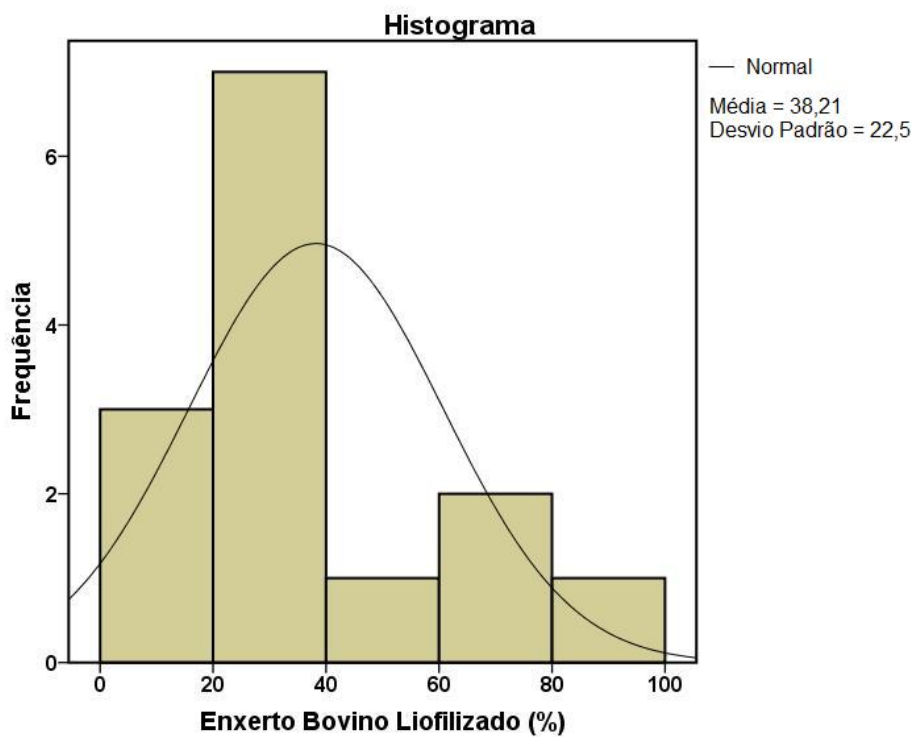


Gráfico 2 – Histograma da proporção de EBL remanescente

Teste de Kolmogorov-Smirnov confirmando a normalidade da variável EBL no estudo ($p=0,133$)

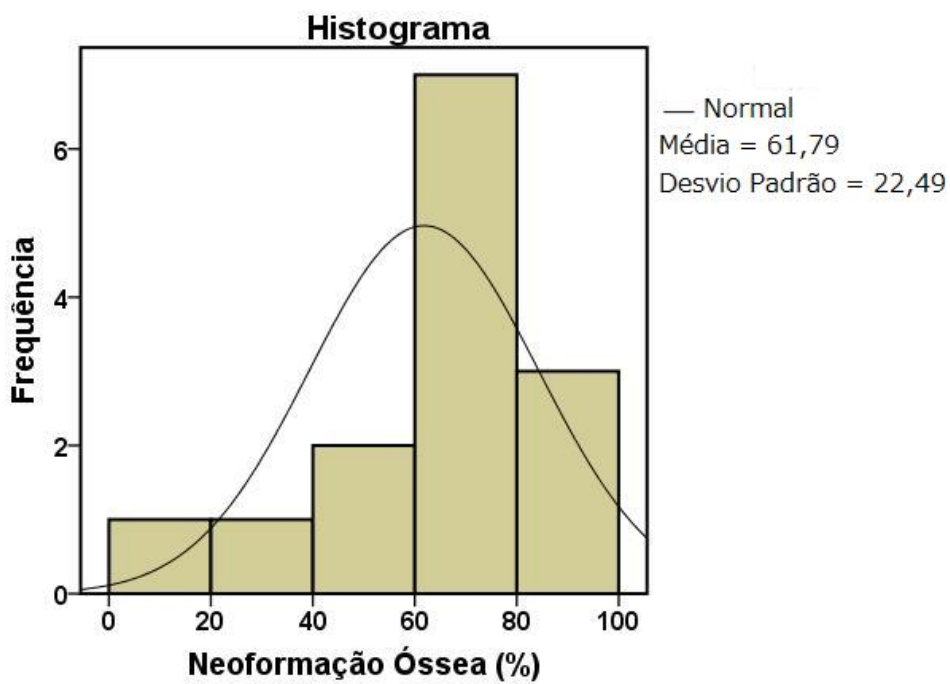


Gráfico 3 – Histograma da proporção de neoformação óssea

Teste de Kolmogorov-Smirnov confirmando a normalidade da variável neoformação no estudo ($p=0,133$)

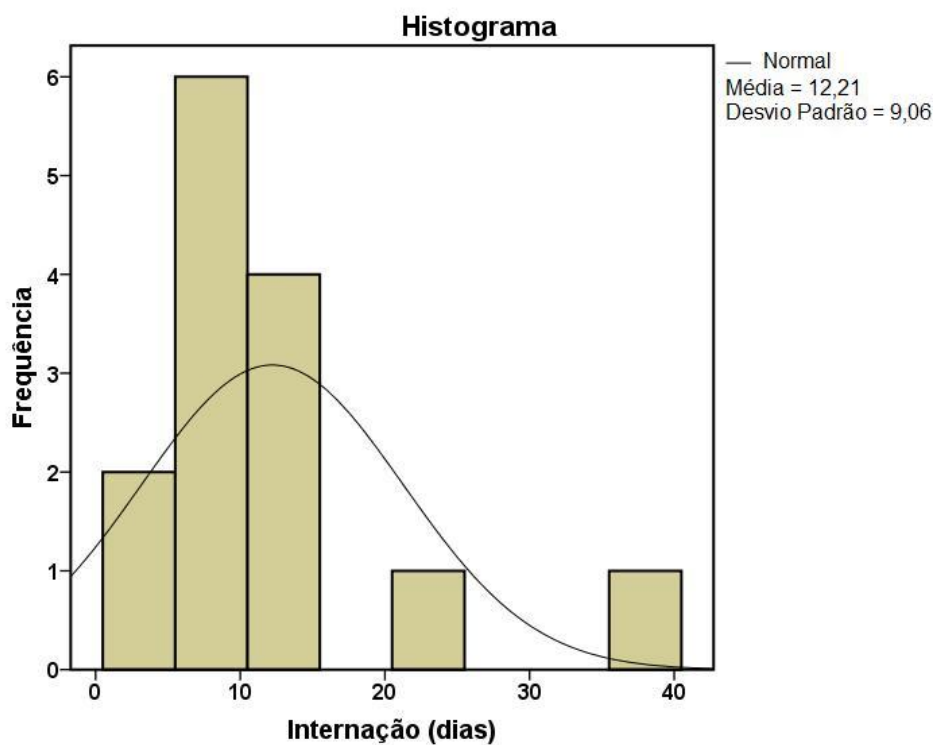


Gráfico 4 - Histograma do tempo de internação

Teste de Kolmogorov-Smirnov confirmando a não normalidade da variável internação no estudo ($p=0,004$)

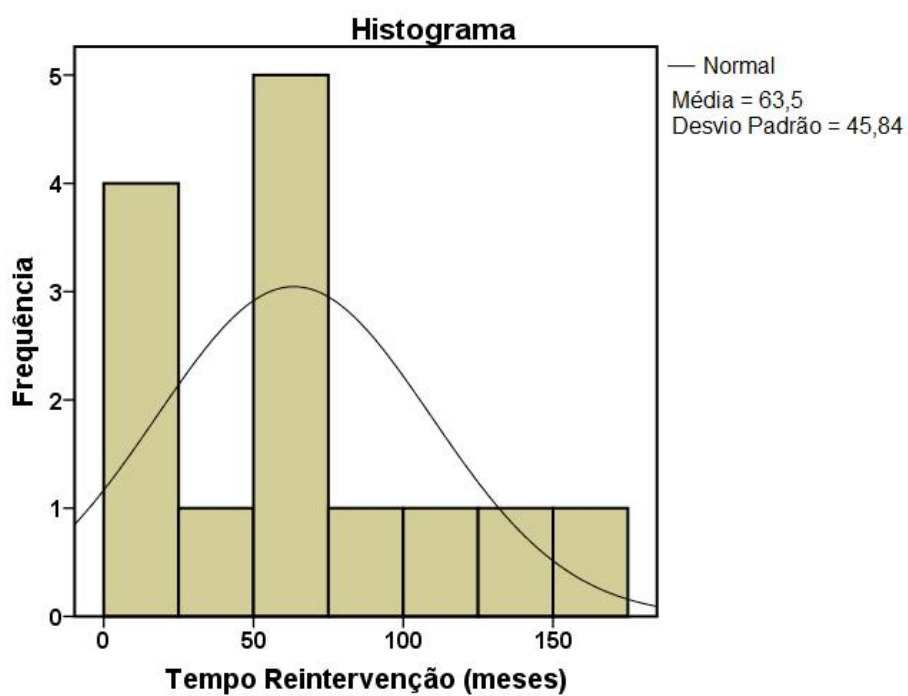


Gráfico 5 – Histograma do tempo de reintervenção

Teste de Kolmogorov-Smirnov confirmando a normalidade da variável reintervenção no estudo ($p=0,200$)

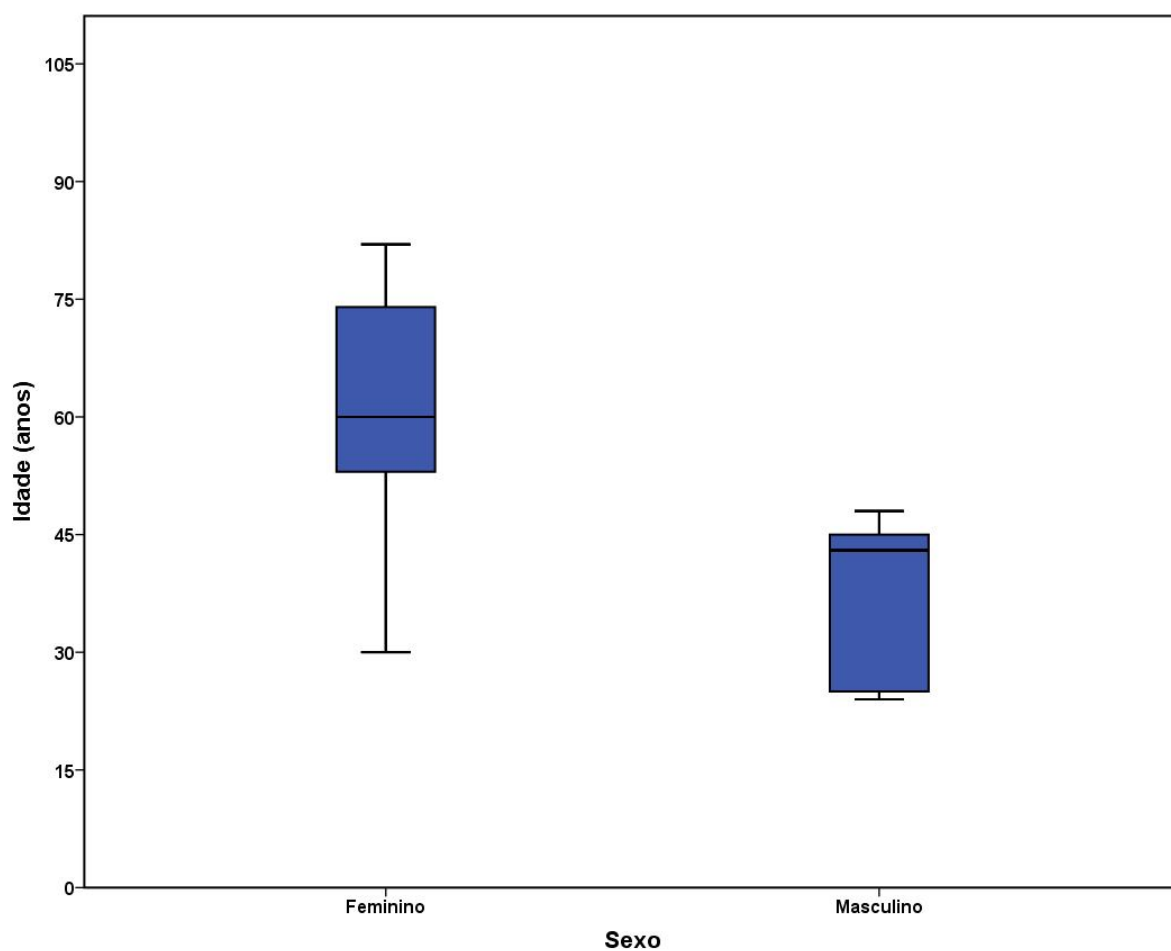


Gráfico 6 – Gráfico de caixas da distribuição da idade entre os gêneros

Os pacientes do sexo feminino eram mais velhos do que os pacientes do sexo masculino (teste de Mann-Whitney, $p=0,007$). Os pacientes do sexo feminino com 61 ± 16 anos (60, IQ 52-77) e do sexo masculino 37 ± 12 anos (43, IQ 25-47).

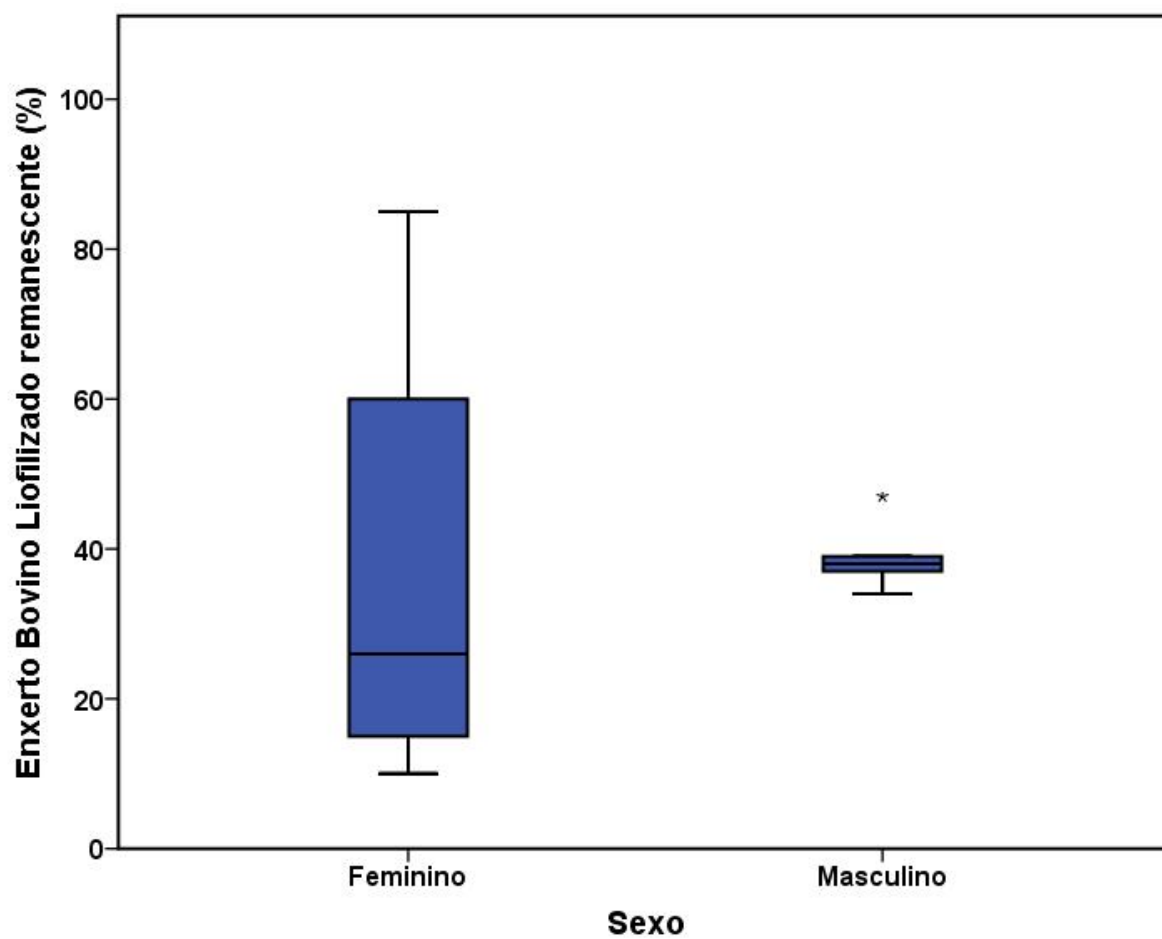


Gráfico 7 – Gráfico de caixas da proporção de EBL remanescente entre os gêneros
Não houve diferença significativa entre a proporção de EBL remanescente entre os gêneros (teste de ANOVA, $p=0,927$). O gênero feminino correspondendo a $37,78 \pm 28,46$ % (26, IQ 15-85) e o gênero masculino correspondendo a $39 \pm 4,85$ dias (39, IQ 37-47).

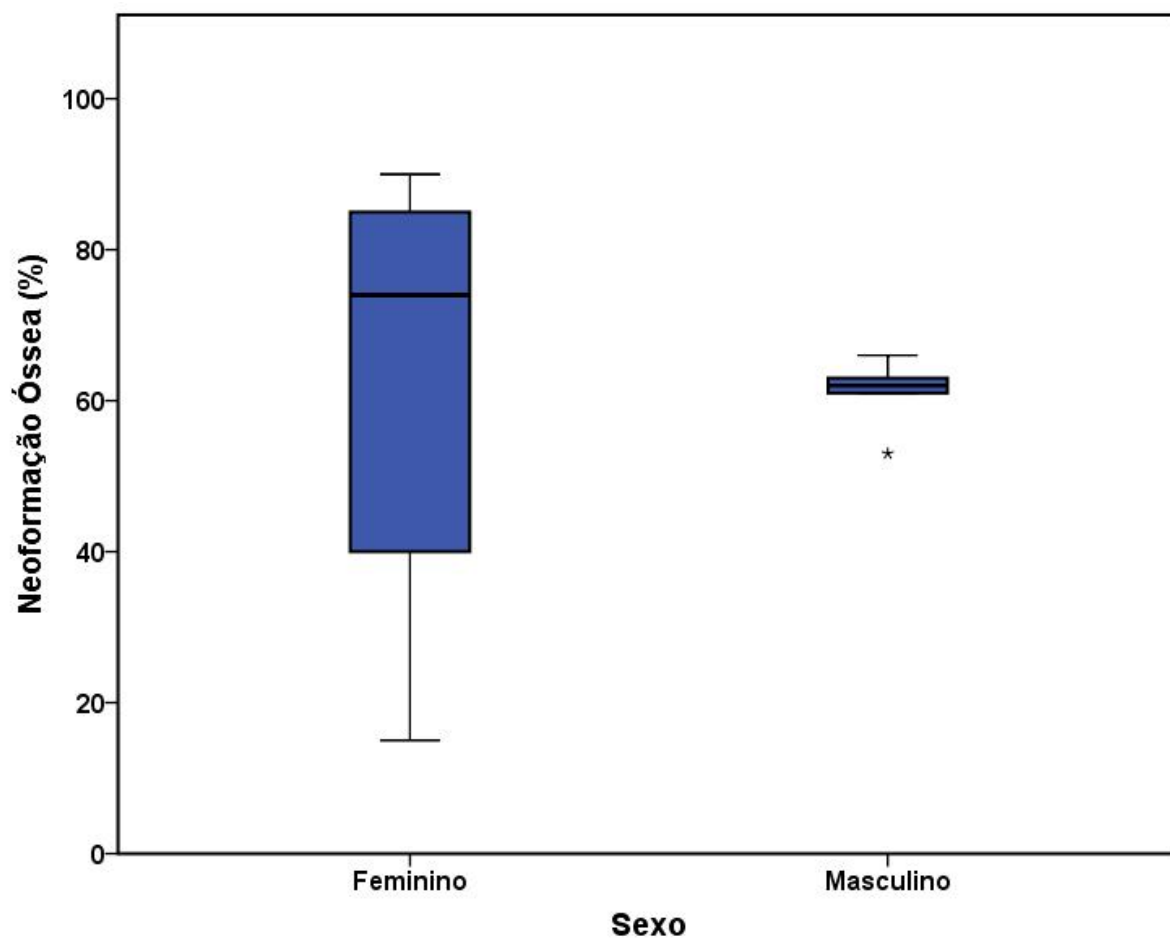


Gráfico 8 – Gráfico de caixas da distribuição da neoformação óssea entre os gêneros

Não houve diferença significativa entre a proporção de neoformação óssea entre os gêneros (teste de ANOVA, $p=0,927$). O sexo feminino correspondendo a $62,22 \pm 28,46$ % (74, IQ 40-90) e os do sexo masculino correspondendo a $61 \pm 4,85$ % (62, IQ 61-66).

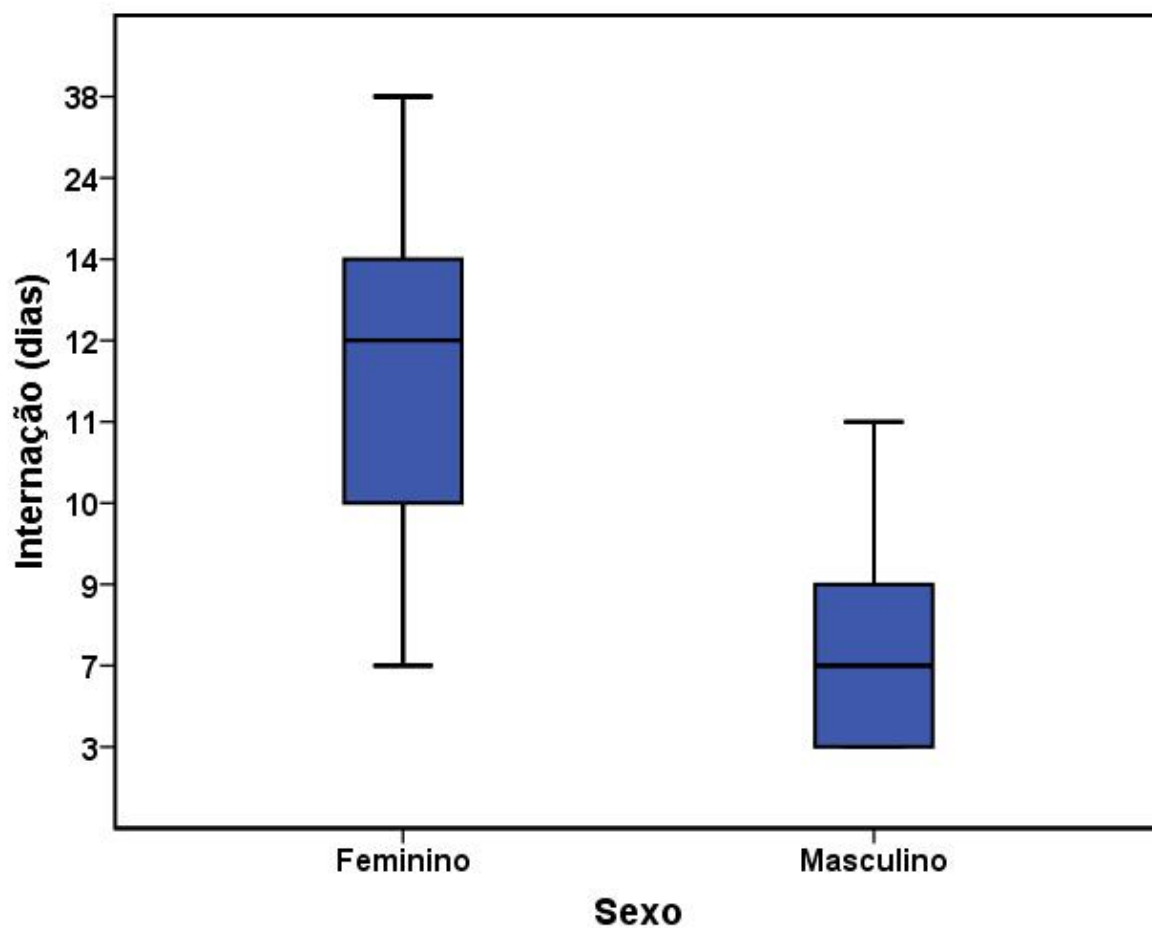


Gráfico 9 – Gráfico de caixas do tempo de internação entre os gêneros

O sexo feminino permaneceu maior tempo internado do que o sexo masculino (teste de Mann-Whitney, $p=0,029$). Os pacientes do sexo feminino correspondendo a 15 ± 10 dias (12, IQ 10-38) e os do sexo masculino correspondendo a 7 ± 4 dias (7, IQ 3-11).

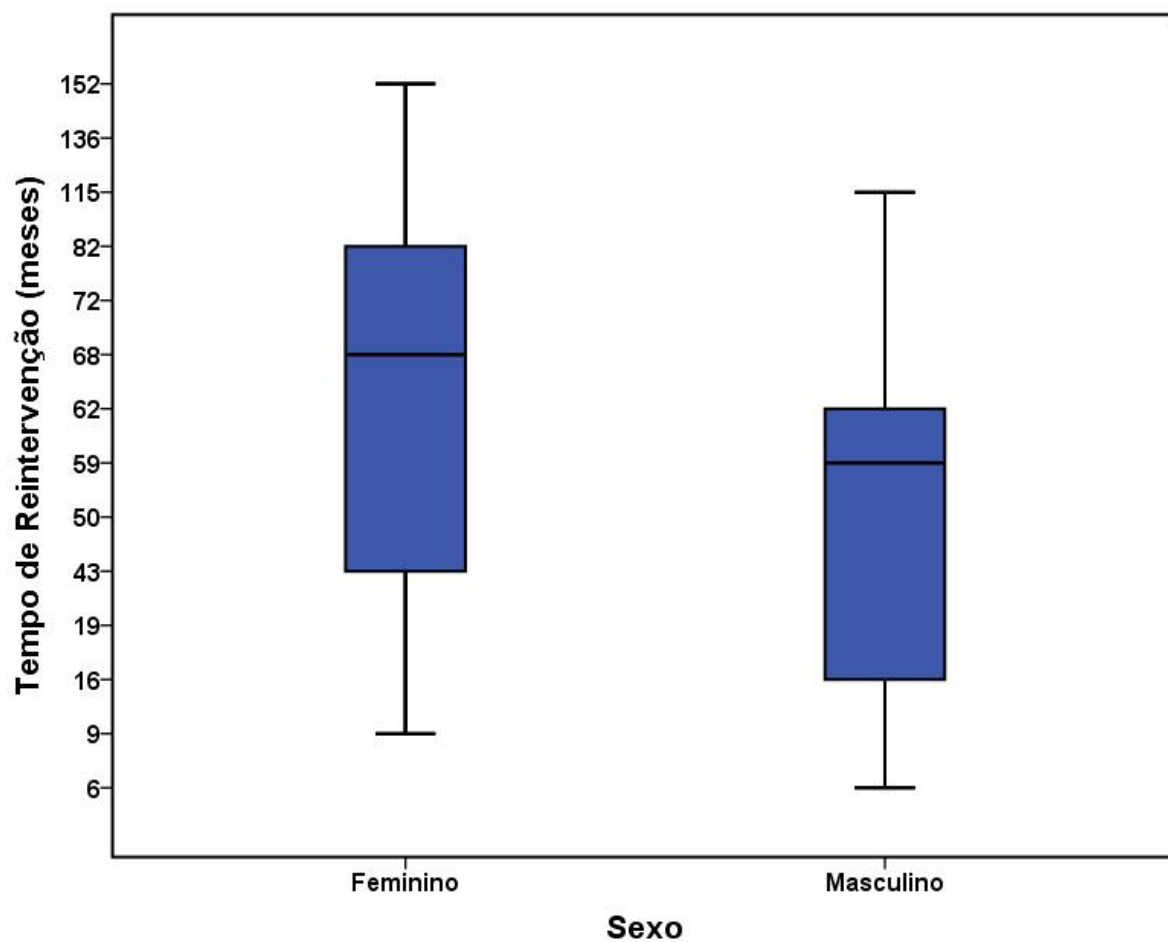


Gráfico 10 – Gráfico de caixas do tempo de reintervenção entre os gêneros

Não houve diferença significativa entre o tempo de reintervenção entre os gêneros (teste de ANOVA, $p=0,491$).

O gênero feminino correspondendo a 70 ± 48 meses (68, IQ 43-158) e o gênero masculino correspondendo a 52 ± 43 meses (59, IQ 16-115).

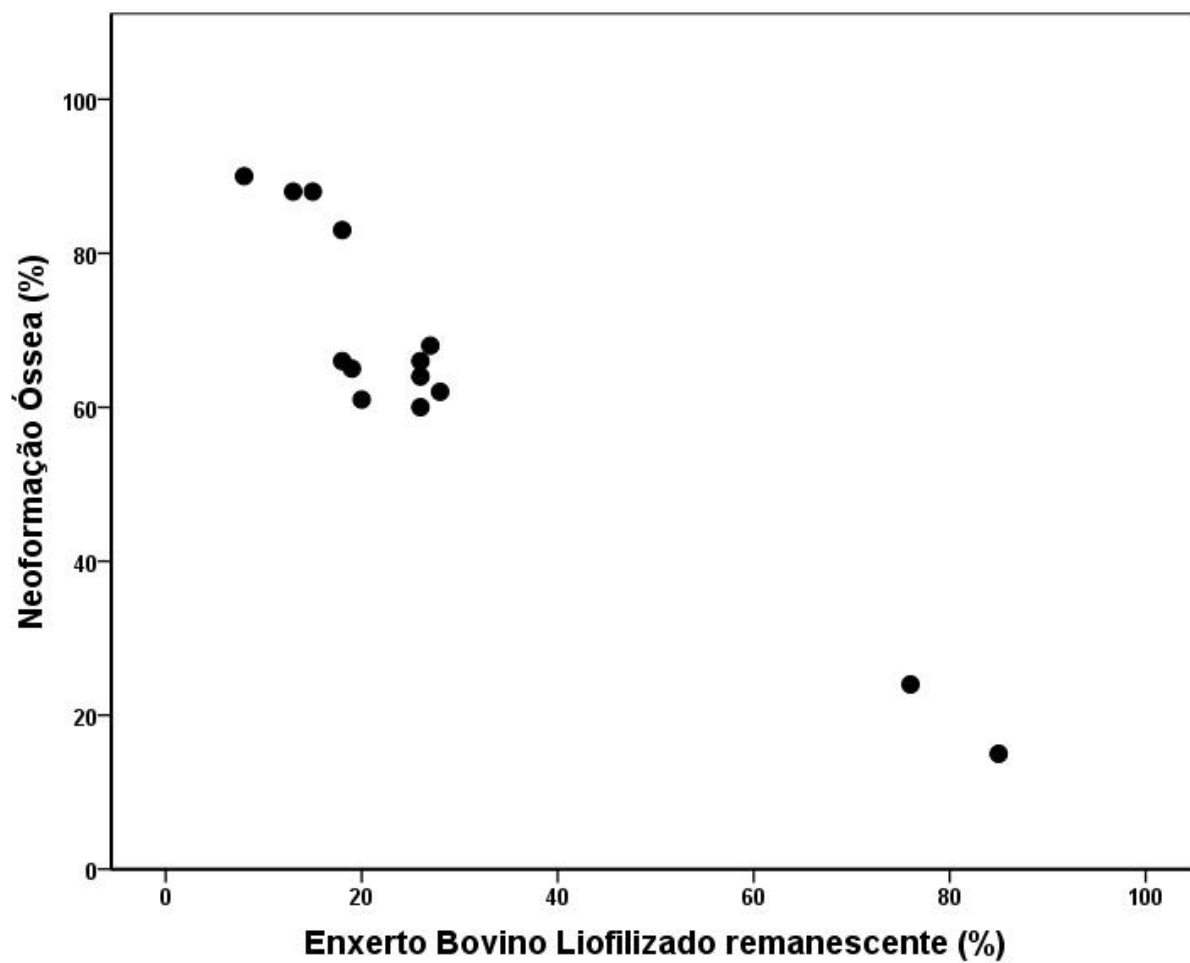


Gráfico 11 – Diagrama de dispersão entre a neoformação óssea e o Enxerto Bovino Liofilizado remanescente.

Foi encontrada correlação entre a proporção de neoformação óssea e a proporção de enxerto bovino liofilizado remanescente no presente estudo (teste de Pearson, $p=0,001$ e $r=-1,000$).

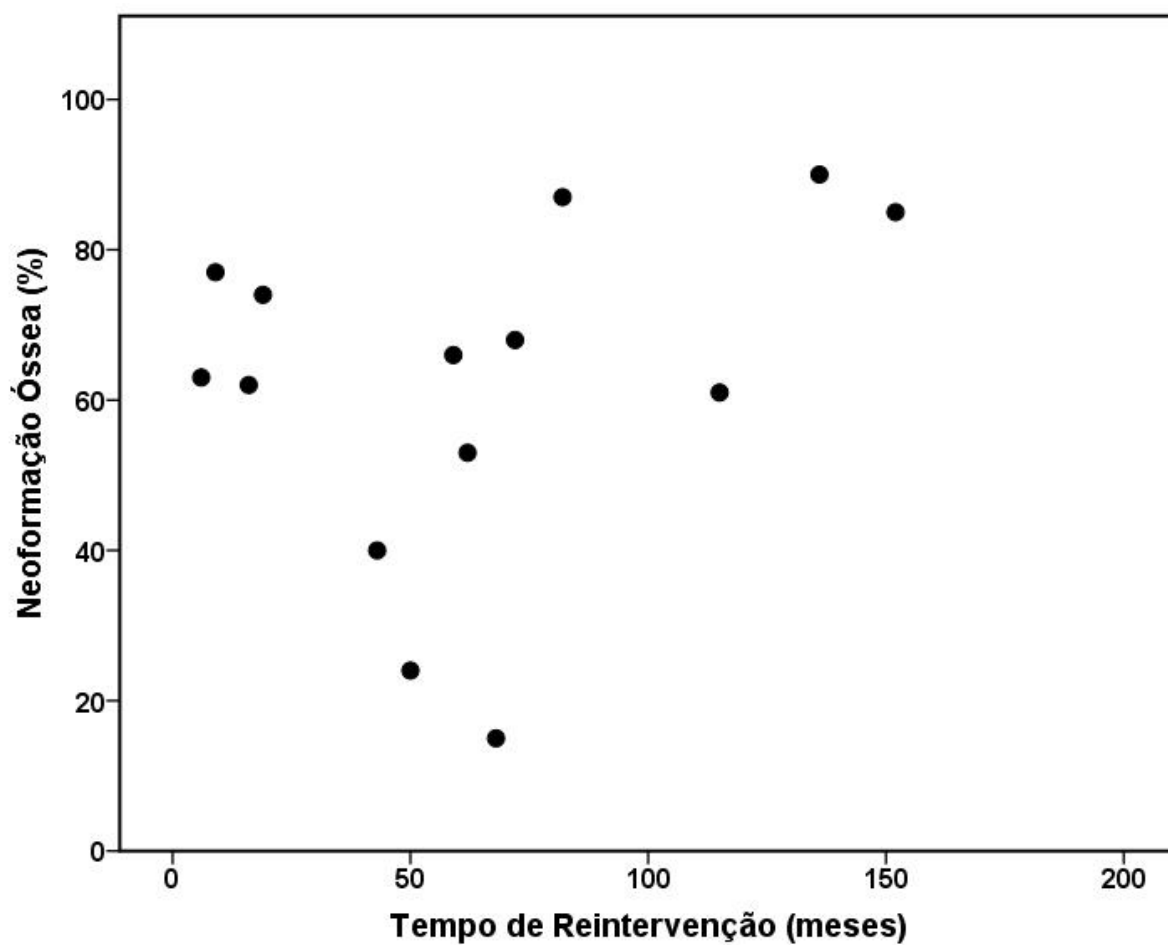


Gráfico 12 – Diagrama de dispersão entre a neoformação óssea e o tempo de reintervenção
Não houve correlação entre o tempo de reintervenção e a proporção de neoformação óssea no presente estudo (teste de Pearson, $p=0,317$ e $r=0,288$).

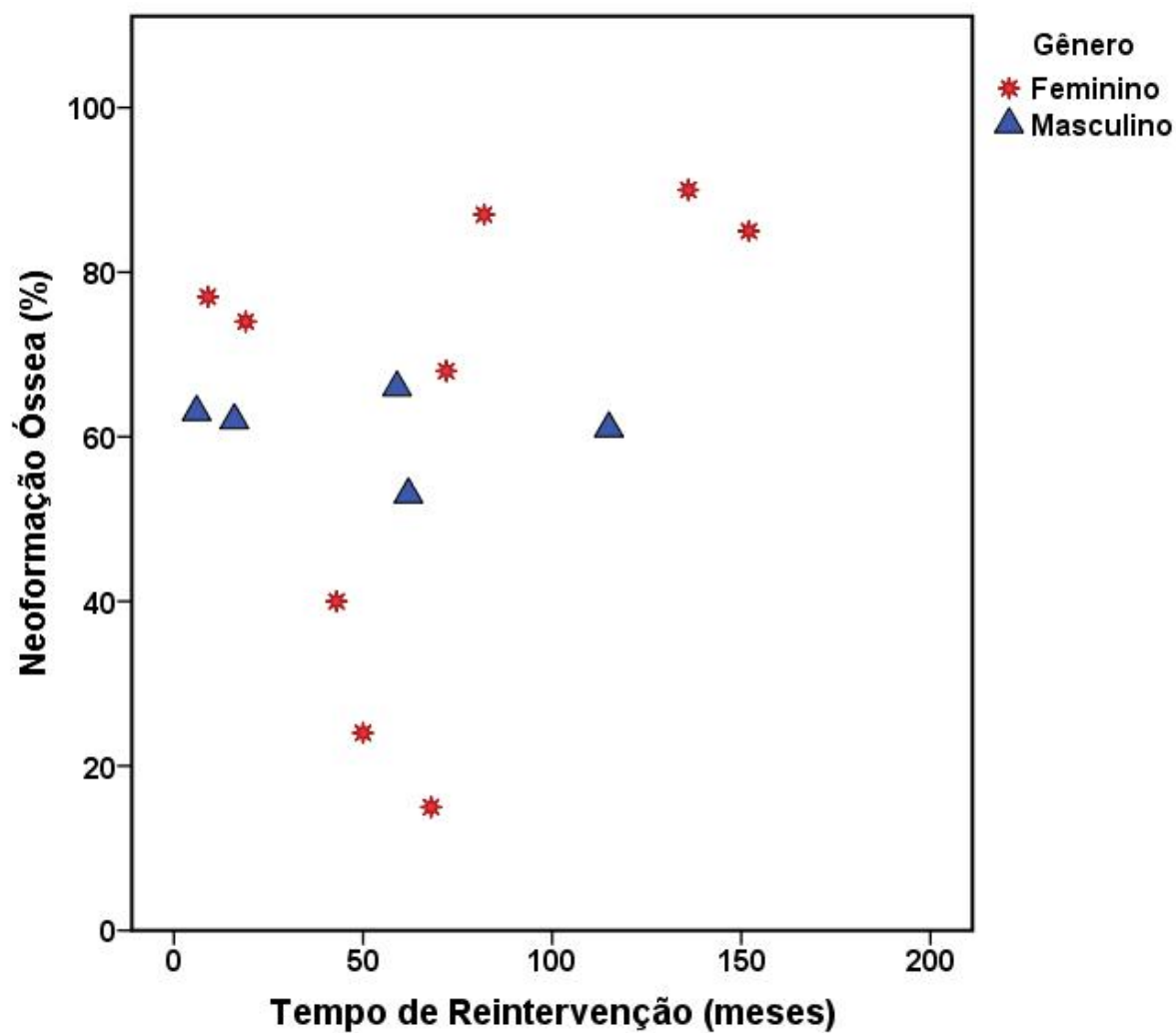


Gráfico 13 – Diagrama de dispersão entre a neoformação óssea e o tempo de reintervenção de acordo com o gênero

Não houve padrão de correlação observado no gráfico ao qual pudéssemos inferir relação entre o tempo de reintervenção e a neoformação óssea nos diferentes gêneros.

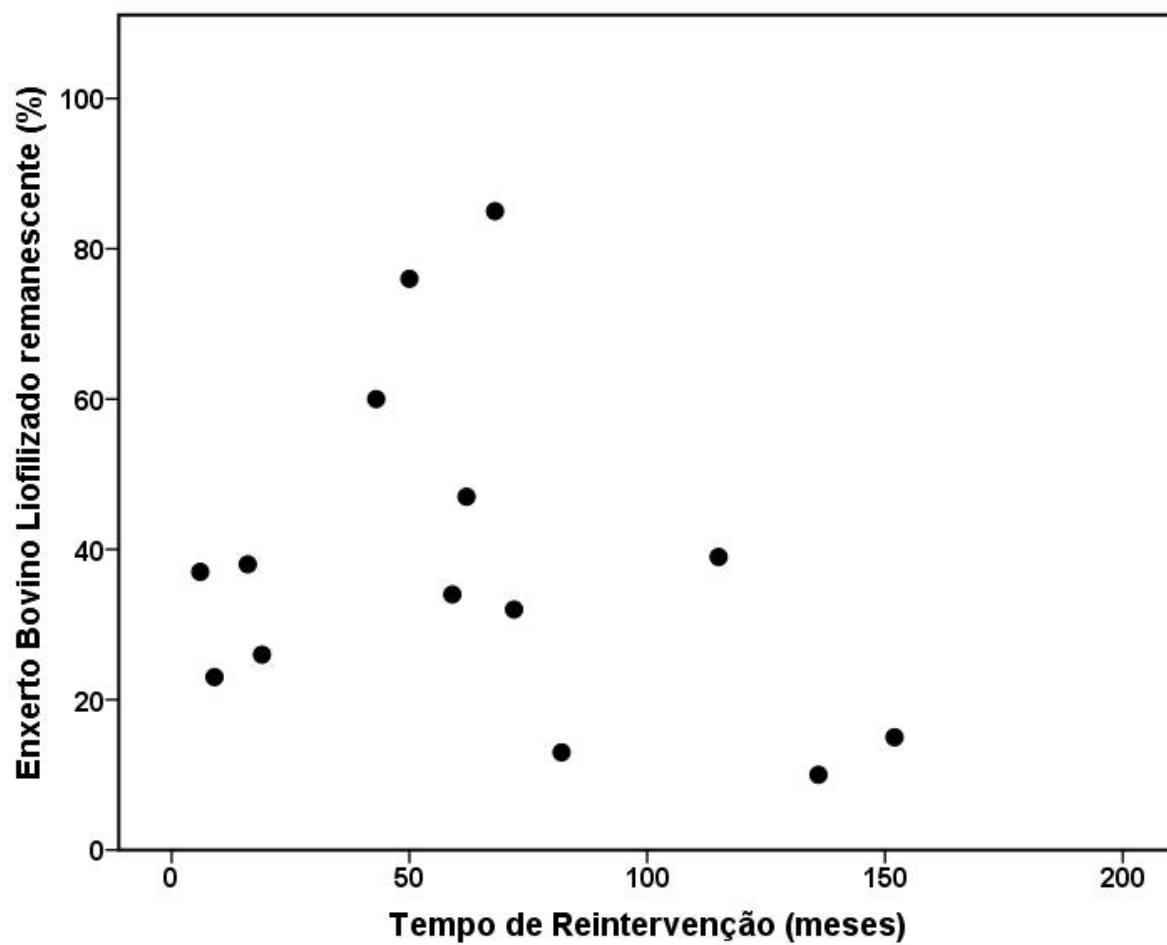


Gráfico 14 – Diagrama de dispersão entre a proporção de EBL e o tempo de reintervenção
Não houve correlação entre o tempo de reintervenção e a proporção de EBL remanescente no presente estudo (teste de Pearson, $p=0,317$ e $r=-0,288$).

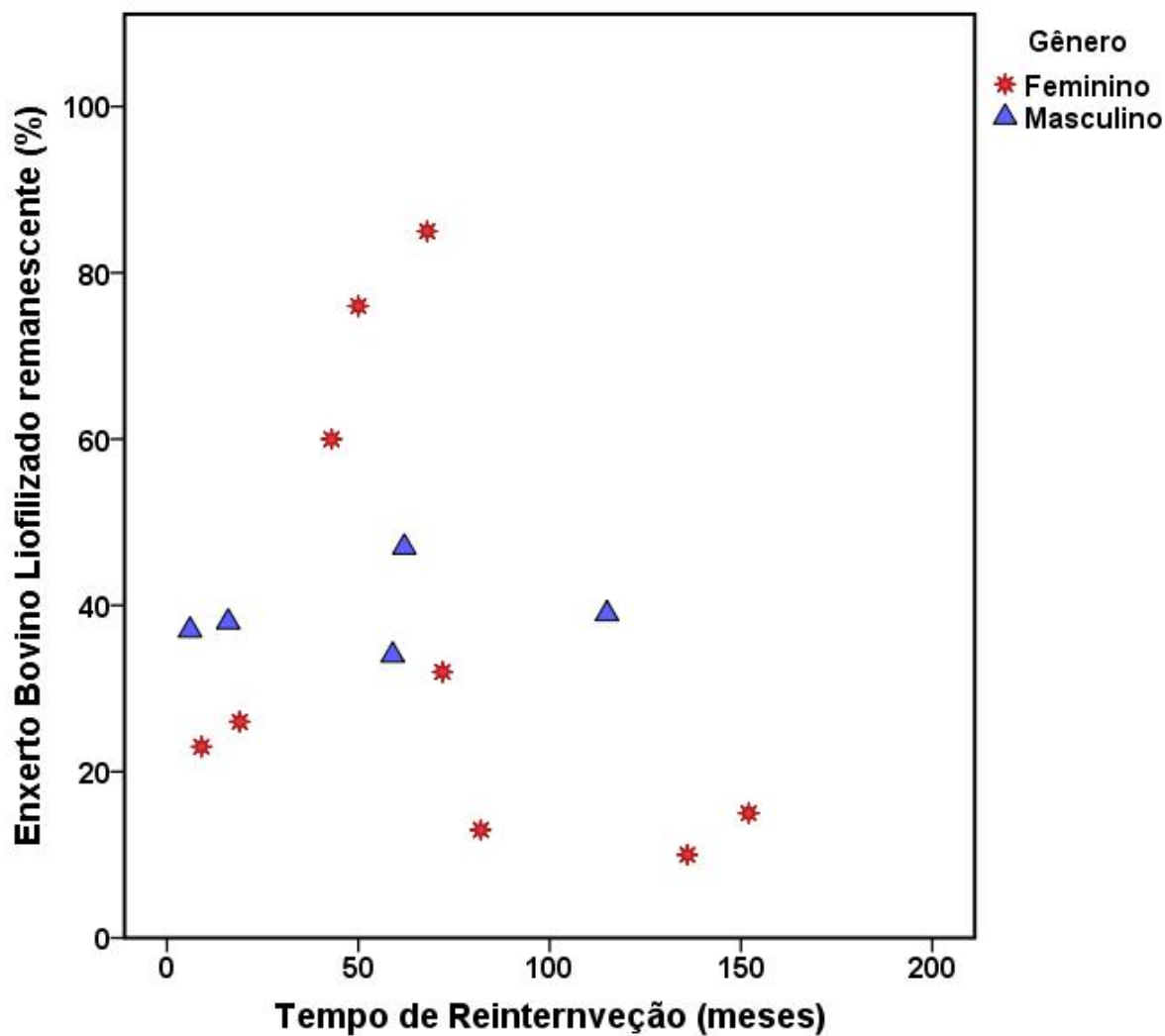
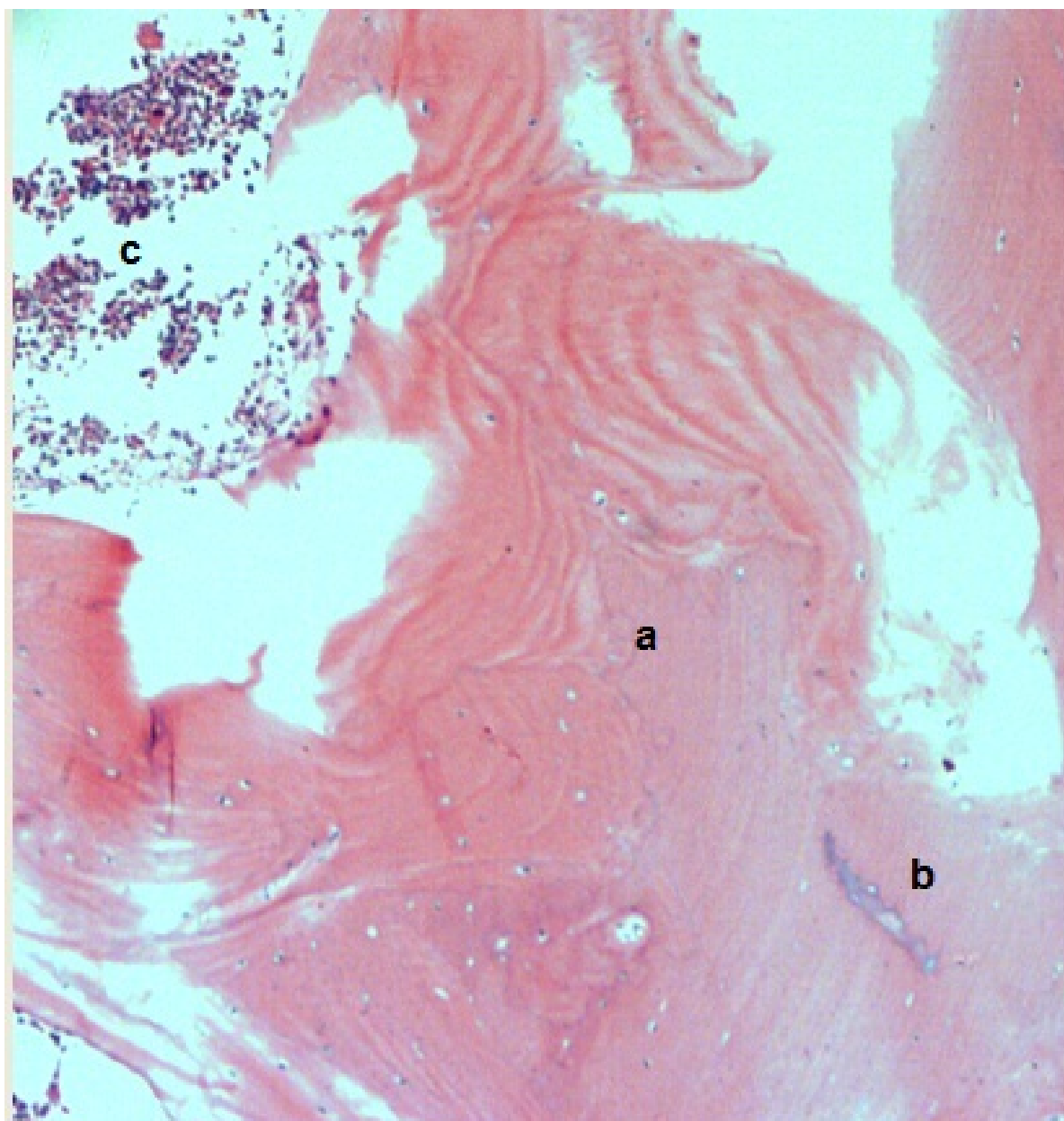


Gráfico 15 – Diagrama de dispersão entre a proporção de EBL remanescente e o tempo de reintervenção de acordo com o gênero

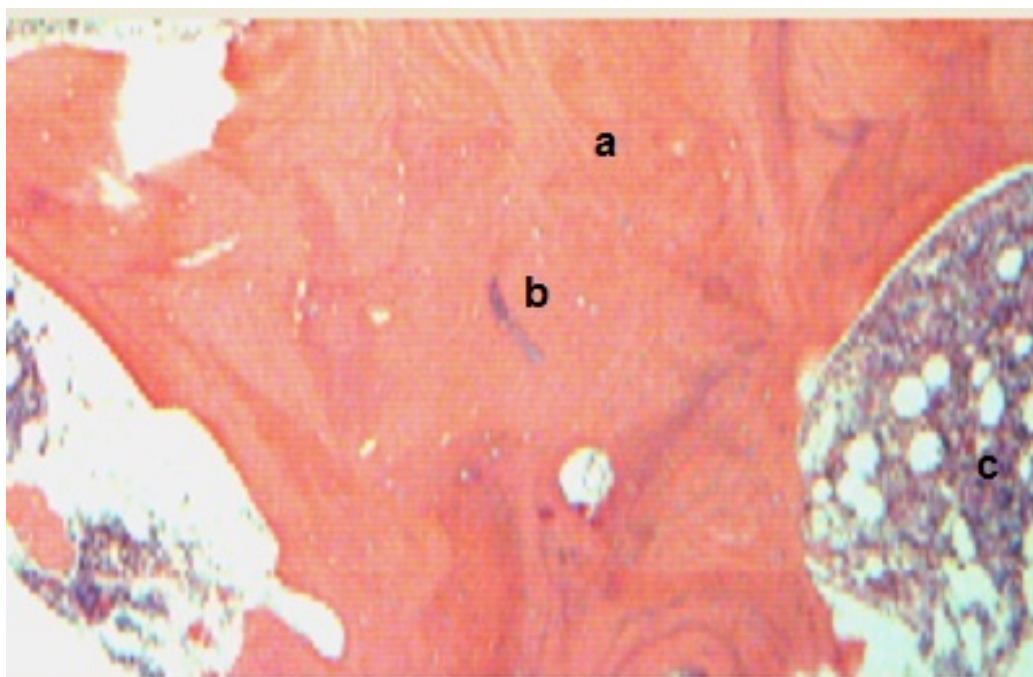
Não houve padrão de correlação observado no gráfico ao qual pudéssemos inferir relação entre o tempo de reintervenção e a quantidade de EBL remanescente nos diferentes gêneros.

Apêndice B – Lâminas



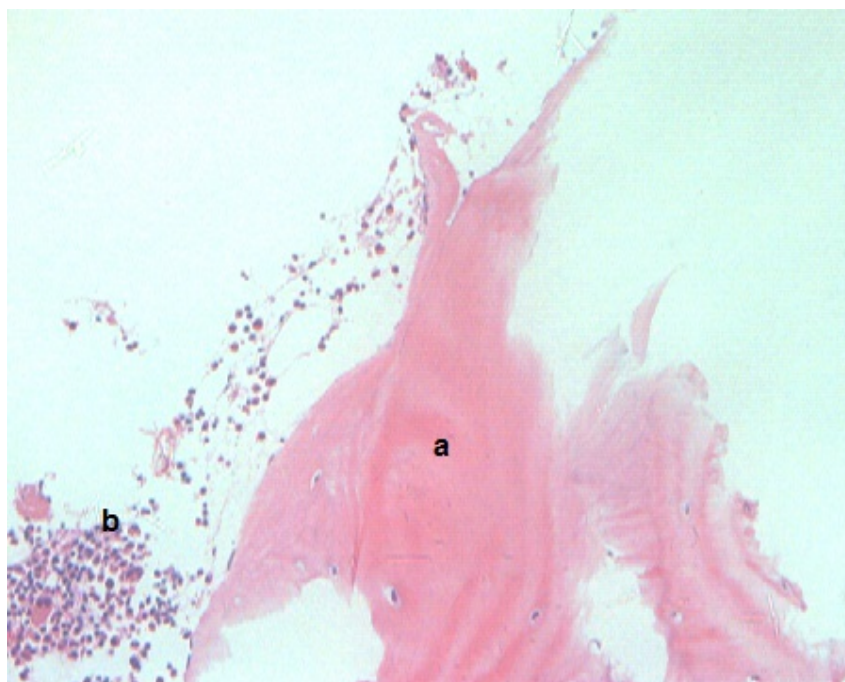
Lâmina 1 – Lâmina histológica

Figura mostrando uma lâmina utilizada neste estudo com um corte de 200 μ m em uma magnificação de 100x mostrando o enxerto bovino liofilizado em azul o osso neoformado em rosa (presente na maior parte da matriz óssea). **a)** Neoformação óssea; **b)** Enxerto bovino liofilizado; **c)** Tecido fibroso.



Lâmina 2 – Lâmina histológica

Figura mostrando outra lâmina utilizada neste estudo com um corte de 200 μ m em uma magnificação de 100x mostrando o enxerto bovino liofilizado em azul e o osso neoformado em rosa (presente na maior parte da matriz óssea). **a)** Neoformação óssea; **b)** Enxerto bovino liofilizado; **c)** Tecido fibroso.



Lâmina 3 – Lâmina histológica

Figura de outra lâmina utilizada também analisada neste estudo com um corte de 200 μ m em uma magnificação de 100x mostrando apenas a presença de osso neoformado (rosa) na matriz óssea. **a)** Neoformação óssea; **b)**

Tecido

fibroso.

Apêndice C – Publicação – apenas acessando o site da revista

Artigo publicadona revista CellandTissue Bank