

## Aloenxerto ósseo cortical desvitalizado com nitrogênio líquido – estudo experimental em ovelhas

### Allogeneic bone graft devitalized in liquid nitrogen – sheep experimental study

Paulo Barros de Albuquerque<sup>I</sup> Brunna de Souza Barni<sup>II</sup> Renato Barbosa Silva<sup>I</sup>  
Thadeu Mourão Pinto<sup>I</sup> Giordano Cabral Gianotti<sup>I</sup> Lanucha Fidelis da Luz Moura<sup>I</sup>  
Mariana Zacoutegu Boss<sup>II</sup> Marcelo Meller Alievi<sup>III</sup>

#### RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a taxa e a forma de incorporação do aloenxerto ósseo cortical, submetido ao congelamento em nitrogênio líquido e inserido em tíbias de ovelhas. Foram utilizadas seis ovelhas clinicamente sadias que, aos pares, foram simultaneamente submetidas à osteotomia da diáfise tibial para a retirada de um segmento de 7cm que, após a desvitalização em nitrogênio líquido, foi implantado imediatamente no outro paciente e fixado com placa de compressão dinâmica (PCD) e parafusos corticais. Realizaram-se avaliações clínicas e radiográficas, imediatamente e a cada 30 dias, até o 180º dia de pós-operatório. Aos 180 dias, foi realizada eutanásia e coletou-se a tibia direita para avaliação histopatológica. Aos 60 dias de pós-operatório, foi observado o uso funcional do membro operado, sendo a união radiográfica das interfaces proximal e distal verificadas, em média, aos 95 dias. Com isso, pôde-se concluir que o nitrogênio líquido é um método adequado de desvitalização de aloimplantes ósseos corticais de ovelhas, proporcionando altas taxas de incorporação óssea, em média, aos 95 dias de pós-operatório.

**Palavras-chave:** enxerto ósseo alógeno, incorporação, placa de compressão dinâmica, ortopedia, ovino.

#### ABSTRACT

This study evaluated the allogeneic cortical bone graft incorporation after submission of the harvested fragment to a bout freezing in liquid nitrogen. Six adult sheep, clinically healthy, were submitted to a 7cm osteotomy of the tibial diaphysis. The fragment was submersed in a liquid nitrogen and implanted in another sheep missing a same-sized segment at the corresponding bone. Stabilization of the allograft in the host bone was

accomplished by a dynamic compressive plate (DCP). Clinical and radiographic evaluations were performed in the immediate post-operative period and in every 30 days for six months after surgery. The proximal and distal host-graft interfaces showed radiographic union at a mean postoperative time of 95 days in all the animals. The cortical bone allograft submitted to liquid nitrogen freezing provided adequate bone healing in the sheep model.

**Key words:** allogeneic bone graft, incorporation, dynamic compressive plate, orthopedics, ovine.

#### INTRODUÇÃO

Na rotina de clínicas e hospitais veterinários, a ocorrência de fraturas cominutivas de ossos longos, neoplasias ósseas, não uniões e más uniões é comum em cães e gatos. O uso de enxerto ou implantes, como forma de substituição de um segmento ou preenchimento de uma falha óssea, é opção de tratamento dessas afecções ortopédicas (BLOOMBERG et al., 1984; MORELLO et al., 2001; ALIEVI, 2007).

Os implantes ósseos alógenos, que são provenientes de outro indivíduo da mesma espécie, porém geneticamente diferente (PIERMATTEI & FLO, 1999), são uma das opções para essas afecções, podendo ser conservados de diversas formas, motivo pelo qual têm sido amplamente utilizados, obtendo resultados satisfatórios (MORELLO et al., 2001). As

<sup>I</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Faculdade de Veterinária (FAVET), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>II</sup>Programa de Residência em Medicina Veterinária, FAVET, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>III</sup>Departamento de Medicina Animal, FAVET, UFRGS, Av. Bento Gonçalves, 9090, Bairro Agronomia, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. E-mail: marcelo.alievi@ufrgs.br. Autor para correspondência.

vantagens deste tipo de implante, quando comparado com o enxerto autógeno, são diminuição da morbidez, da dor, dos custos, e dos tempos cirúrgico e anestésico (MILLIS & MARTINEZ, 2003), além de também poder ser utilizado para aumentar ou melhorar a congruência articular, como na displasia coxofemoral, tratada com acetabuloplastia extracapsular (FERREIRA et al., 2007). Os implantes ósseos corticais alógenos também podem ser usados em defeitos corticais grandes na diáfise de ossos longos (KERWIN et al., 1991). Também são empregados para alongamento ósseo, no tratamento de má união e não união de fraturas e no salvamento de membros com tumores ósseos (LaRUE et al., 1989; SINIBALDI, 1989). As contraindicações da utilização desses implantes ocorrem nos casos de fraturas expostas, áreas com infecção e situações em que a fixação interna rígida não pode ser aplicada ao implante e ao osso hospedeiro (MILLIS & MARTINEZ, 2003).

Os principais métodos de desvitalização extracorpórea de ossos corticais já descritos são a autoclavagem, a pasteurização, a irradiação e o congelamento com nitrogênio líquido (TSUCHIYA et al., 2010). As vantagens descritas do nitrogênio líquido, comparado aos outros métodos de desvitalização óssea, são o baixo custo, a pequena quantidade de equipamento especializado necessário, a simplicidade da técnica e a dispensa do controle rigoroso da temperatura durante a desvitalização (BURACCO et al., 2002; YAMAMOTO et al., 2003; TSUCHIYA et al., 2010). Outra vantagem também descrita por YAMAMOTO et al. (2003) é a manutenção da resistência dos ossos corticais submetidos à desvitalização com nitrogênio líquido.

Em medicina veterinária, ainda são raros os relatos da utilização de desvitalização extracorpórea de osso cortical com nitrogênio líquido. Porém, na medicina humana, essa substância está sendo cada vez mais utilizada, pois diminui as chances de reações imunogênicas e a transmissão de doenças, além de evitar a necessidade de formação de um banco de ossos (BURACCO et al., 2002; BOSTON et al., 2007).

Sendo assim, o presente experimento avaliou a taxa e a forma de incorporação de enxertos ósseos corticais alógenos desvitalizados com nitrogênio líquido e inseridos em tíbias de ovelhas, visando à preservação do membro locomotor.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas seis ovelhas adultas clinicamente sadias, da raça Corriedale, com idade estimada entre dois e três anos, pesando entre 40

e 50 quilogramas (kg), sendo mantidas em baias coletivas de 12 metros quadrados, com três animais em cada baia, onde permaneceram até o término das avaliações. Recebiam água *ad libitum*, ração comercial para ovinos e feno de alfafa na quantidade e proporção recomendadas para a espécie. Passaram por um período de adaptação de pelo menos 14 dias antes do procedimento cirúrgico, quando se realizava exame clínico geral e exames pré-anestésicos (hemograma completo, dosagem de aspartato-aminotransferase e creatinina), além de exame radiográfico da tíbia direita nas projeções craniocaudal e mediolateral, para descartar qualquer alteração pré-existente. Os procedimentos cirúrgicos foram realizados em três dias, sendo que em cada dia foram operadas duas ovelhas simultaneamente, por equipes anestésicas e cirúrgicas distintas, com equipamentos e instrumentais independentes.

No dia anterior a cada cirurgia, os animais foram submetidos à tricotomia de toda a circunferência da tíbia direita, ampliada até a região média da coxa (limite proximal) e até abaixo do tarso (limite distal). Os animais ficaram em jejum hídrico de 12 horas e sólido de 24 horas, sendo aplicado no pré-operatório imediato enrofloxacina 5mg kg<sup>-1</sup> intramuscular (IM), como terapia antimicrobiana.

Como medicação pré-anestésica (MPA), os animais receberam maleato de acepromazina na dose de 0,1mg kg<sup>-1</sup>, e meperidina na dose de 3mg kg<sup>-1</sup>, ambos IM. Após 15 minutos da MPA, foi utilizado propofol na dose de 5mg kg<sup>-1</sup> para indução anestésica, pela via intravenosa (IV), seguida de intubação orotraqueal. A manutenção anestésica foi realizada com isoflurano em oxigênio 100%, utilizando aparelho de anestesia inalatória em circuito anestésico semiaberto. Durante o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em fluidoterapia com solução de ringer lactato, em gotejamento venoso de 15mL kg<sup>-1</sup> por hora, pela veia cefálica, e recebiam citrato de fentanila por essa via (2mg kg<sup>-1</sup> IV) em caso de superficialização do plano anestésico ou qualquer sinal de dor.

Após a indução anestésica, os animais foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito lateral direito, com o membro a ser operado apoiado lateralmente à mesa. A antisepsia foi realizada utilizando o método com álcool e povidine (duas aplicações de álcool com 30 segundos de contato cada, intercaladas por uma aplicação de povidine durante dois minutos). A região distal do membro foi envolvida com gaze tubular previamente esterilizada. Foi efetuado acesso medial à diáfise tibial direita com incisão de pele e afastamento dos tecidos moles adjacentes utilizando dois afastadores de Farabeuf. A

região da diáfise foi exposta e osteotomizada, sendo protegida com afastadores flexíveis de Haberer. As osteotomias proximal e distal foram realizadas com serra oscilatória pneumática, retirando-se um fragmento ósseo de 7cm de comprimento. Durante a osteotomia, a área foi constantemente irrigada com solução salina 0,9% estéril em temperatura ambiente. Realizada a osteotomia, removeu-se o periosteio, o endosteio e a medula óssea do segmento ósseo, e novamente lavou-se com solução salina 0,9% estéril. Este segmento foi implantado no outro animal da mesma espécie, promovendo a troca dos implantes entre os dois indivíduos após passar pelo processo de desvitalização extracorpórea através da imersão em nitrogênio líquido por 20 minutos, seguido de descongelamento em temperatura ambiente por 15 minutos e imersão em solução salina 0,9% estéril por mais 15 minutos.

Para a fixação do aloimplante ósseo, foi utilizada uma placa de compressão dinâmica de dez furos, com 170mm de comprimento, 12mm de largura e 4mm de espessura, e oito parafusos corticais com 4,5mm de diâmetro. O aloimplante foi inserido na falha óssea e fixado temporariamente à placa, previamente curvada para adaptar-se perfeitamente ao leito receptor, com pinças espanholas. Utilizando um motor pneumático ortopédico e broca de 3,2mm de diâmetro, fez-se um orifício em cada cortical do implante, seguido da confecção da rosca com macho e inserção do parafuso. Este procedimento foi repetido, resultando na fixação definitiva do implante à placa com dois parafusos.

Em seguida, realizou-se a fixação da placa temporariamente aos segmentos proximal e distal da face medial da tíbia com pinças de espanholas. Para a fixação definitiva, foram utilizados seis parafusos, três no fragmento proximal e três no distal. Os dois parafusos imediatamente adjacentes ao implante foram inseridos primeiramente e com efeito compressivo, utilizando-se o guia de broca compressivo. A seguir, os demais parafusos foram inseridos de maneira aleatória, porém intercalando-se os segmentos e sem efeito compressivo, utilizando-se o guia de broca neutro. A área foi abundantemente lavada com solução salina 0,9% estéril morna. Por fim, suturou-se o tecido subcutâneo (poliglactina 910, n.2-0, padrão contínuo simples) e a pele (mononáilon, n.3-0, padrão isolado simples).

No pós-operatório imediato, os animais receberam cloridrato de tramadol 2mg kg<sup>-1</sup> IM; meloxicam 0,5mg kg<sup>-1</sup> IM, a cada 24 horas por 5 dias; enrofloxacin 5mg kg<sup>-1</sup> IM, a cada 12 horas por 7 dias; sulfato de morfina 0,2mg kg<sup>-1</sup> IM, a

cada 12 horas por dois dias. A ferida cirúrgica foi higienizada diariamente com solução salina 0,9% estéril e mantida com curativo composto por gaze e atadura, até a remoção dos pontos de pele aos 10 dias. Durante o experimento, os animais foram avaliados clinicamente quanto à ingestão de água e alimento, deambulação, aspecto da ferida cirúrgica, déficit de propriocepção e/ou atrofia muscular. Logo após o procedimento cirúrgico, realizou-se uma nova radiografia do membro operado e, posteriormente, para o controle radiográfico, foram repetidas a cada 30 dias até os 180 dias. As execuções dos exames radiográficos foram sempre com o mesmo aparelho radiográfico e carga padrão de 54 quilovolts (kV) e 1.4 miliampere (mA), numa distância de aproximadamente 80cm, nas projeções crânio-caudal e médio-lateral. Estimou-se a união radiográfica no momento em que foi observada a continuidade cortical completa na interface osso/alloimplante e remodelamento ativo dos calos periosteal e endosteal.

Terminada a avaliação radiográfica aos 180 dias, os animais foram submetidos à eutanásia, com cloreto de potássio IV após a anestesia geral com tiopental sódico IV, conforme determina o Conselho Federal de Medicina Veterinária na resolução nº 1000 de maio de 2012. As tíbias direitas foram avaliadas quanto às possíveis alterações como a reação dos tecidos moles, a formação de calo ósseo e a presença de infecção, além do aspecto e a estabilidade da placa, dos parafusos e do aloimplante ósseo. A placa e os parafusos foram retirados, e as tíbias foram armazenadas em formol tamponado a 10%, por no mínimo 72 horas, para posterior avaliação microscópica. Esta avaliação deu-se com a secção das tíbias em seis locais para confecção de três fragmentos (fragmento proximal, a cerca de 1cm da linha de interface osso/alloimplante proximal; fragmento do centro do aloimplante; e fragmento distal, a cerca de 1cm da linha de interface osso/alloimplante distal). Os fragmentos foram descalcificados em ácido nítrico a 10% e processados pela técnica de inclusão em parafina, sendo os cortes histológicos (espessura de 5 micras) corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) e examinados em microscópio óptico.

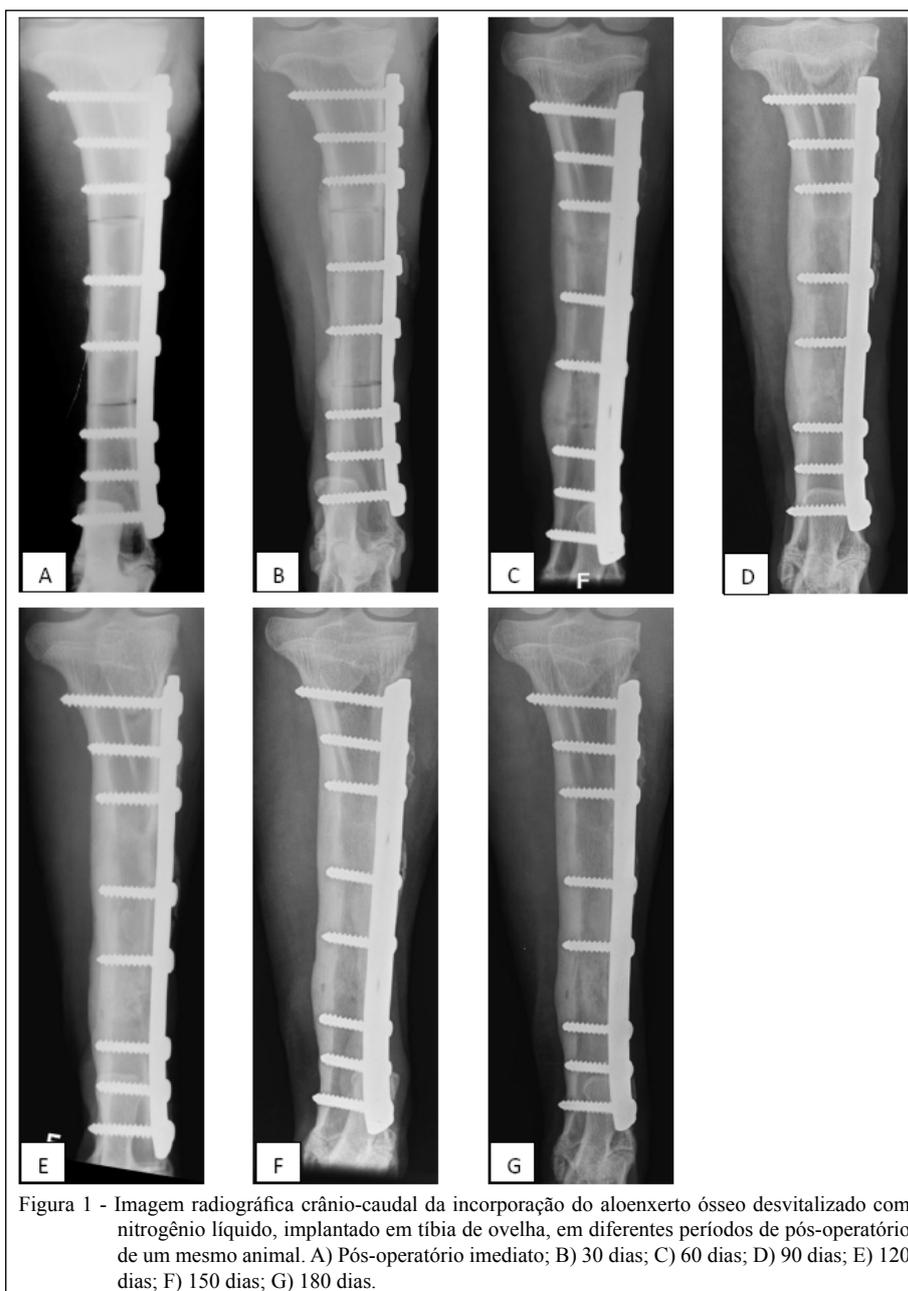
## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O uso funcional do membro operado ocorreu de forma gradual até próximo aos 60 dias de pós-operatório, onde havia completa sustentação do peso, não sendo mais observado claudicação. Em um dos animais, ocorreu fratura do aloimplante ósseo, mas apesar disso não houve diferença quanto ao

tempo da recuperação e ao uso funcional do membro, quando comparado com os demais animais.

O percentual de incorporação/união e da consolidação das 12 interfaces (seis proximais e seis distais) foi de 100%. O tempo médio e o desvio padrão para obtenção desse resultado foi de  $95 \pm 21,53$  dias (mínimo 60 dias e máximo 150 dias). O tempo médio e o desvio padrão para a incorporação da interface proximal foi de  $95 \pm 12,24$  dias e da distal foi de  $95 \pm 29,49$  dias. A evolução da incorporação do

aloenxerto em diferentes períodos de pós-operatório está demonstrada radiograficamente na figura 1. O animal que levou mais tempo para que ocorresse a consolidação foi o que fraturou a região central do aloimplante aos 60 dias, causando envergamento da placa na altura do 5º parafuso e exuberante calo ósseo na região. Apesar disso, ao longo do período de avaliação radiográfica, constatou-se remodelamento e total consolidação da fratura e incorporação do aloimplante. A fratura provavelmente deveu-se à fragilidade óssea



do aloimplante neste período, pela absorção óssea e formação de novo osso, verificadas radiograficamente. Como descrito por FERREIRA (2008), quando o osso implantado vai sendo substituído por novo osso é importante que ele suporte as cargas compressivas provenientes da movimentação do animal, o que não aconteceu no animal em questão.

Nas avaliações *post mortem*, principalmente na região das osteotomias, havia a presença de tecido ósseo envolvendo parcialmente a placa e os parafusos. Microscopicamente foi verificada a presença de osso viável com osteoblastos e osteoclastos nos fragmentos do centro dos aloimplantes, não sendo verificadas alterações relevantes no tecido ósseo das tíbias. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por outro estudo envolvendo autoenxertos ósseos congelados com nitrogênio líquido (SILVA, 2011), demonstrando a adequada incorporação do aloimplante.

As vantagens do nitrogênio líquido como método de desvitalização extracorpórea foram comprovadas, evidenciando-se o baixo custo, a pequena quantidade de equipamento especializado necessário, a simplicidade da técnica e a dispensa de controle rigoroso da temperatura durante a desvitalização, como já relatado anteriormente (TSUCHIYA et al., 2005; TANZAWA et al., 2008; TSUCHIYA et al., 2010). Outra vantagem confirmada é que, além da remoção do endóstio, perióstio e medula óssea diminuir as reações imunogênicas, o processo de desvitalização com o nitrogênio líquido também tem grande participação nesta função (GUITIERRES et al., 2006), diminuindo o risco de rejeição do enxerto/implante ósseo cortical.

PORGEL (1993) relatou a capacidade de desvitalização óssea do nitrogênio líquido. Mesmo essa não sendo tecnicamente testada neste experimento, sabe-se que o nitrogênio líquido tem a capacidade de eliminar agentes infecciosos, como os vírus, diminuindo as chances de transmissão de doenças e também as lesões tumorais benignas e malignas (MORAES et al., 2008). Isso possivelmente acabaria por diminuir a necessidade de formação de um banco de ossos, pela perspectiva de utilizar fragmentos ósseos de indivíduos que já tenham ido a óbito, por exemplo.

YAMAMOTO et al. (2003) verificaram a manutenção da resistência dos ossos submetidos à desvitalização pelo nitrogênio líquido por meio de ensaios biomecânicos. O presente trabalho não submeteu os ossos a tal processo de comprovação de resistência, porém percebeu-se similaridade na resistência durante a perfuração dos aloimplantes e das extremidades tibiais.

No experimento, o processo de descongelamento foi executado lentamente em

temperatura ambiente e só posteriormente realizou-se a submersão em solução salina 0,9%. Acredita-se que, devido a este fato, não foram observadas as complicações durante o descongelamento relatadas por YAMAMOTO et al. (2003), que verificaram a ocorrência de fraturas ou fissuras quando o osso era imediatamente submerso em solução salina 0,9% após a sua desvitalização em nitrogênio líquido.

O método de fixação do aloimplante com placa de compressão dinâmica (PCD) e parafusos foi escolhido por ser amplamente utilizado em medicina veterinária nas cirurgias de preservação do membro (LaRUE et al., 1989; MORELLO et al., 2001; BURACCO et al., 2002; BOSTON et al., 2007) e nas de fixação de implantes ósseos (SINIBALDI, 1989; ALIEVI et al., 2007; FERREIRA, 2008), fornecendo adequada estabilidade biomecânica ao membro, associada à compressão das interfaces implante/osso receptor, situações fundamentais para a incorporação ocorrer (STEVENSON et al., 1991; ALIEVI et al., 2007).

O tempo de incorporação observado radiograficamente, em média, não teve grande variação, quando comparado com o resultado encontrado por SILVA (2011), que foi de 84,54 dias (mínimo 60 e máximo 120 dias) em tíbias de ovelhas que foram tratadas com autoenxerto desvitalizado por nitrogênio líquido. Desta forma, evidenciou-se que esta técnica de desvitalização utilizada não afeta o tempo de incorporação, nem interfere negativamente na incorporação do implante.

## CONCLUSÃO

Neste estudo, pôde-se concluir que o nitrogênio líquido é um método adequado de desvitalização de aloimplantes ósseos corticais de ovelhas, proporcionando altas taxas de incorporação óssea, em média, aos 95 dias de pós-operatório.

## COMITÊ DE ÉTICA

O projeto foi aprovado pela Comissão De Ética No Uso De Animais (CEUA) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - sob o nº 20708.

## REFERÊNCIAS

ALIEVI, M.M. et al. Implante ósseo cortical alógeno conservado em mel na reconstrução de falha óssea diafisária em fêmur de cães: avaliação clínica e radiográfica. *Ciência Rural*, v.37, n.2, p.450-457, 2007. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782007000200024&script=sci\\_abstract&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782007000200024&script=sci_abstract&tlng=pt)>. Acesso em: 20 set. 2013. doi: 10.1590/S0103-84782007000200024.

- BOSTON, S.E. et al. Intraoperative radiation for limb-sparing of the distal aspect of the radius without transcarpal plating in five dogs. **Veterinary Surgery**, n.36, p.314-323, 2007.
- BLOOMBERG, M.S. et al. Frozen diaphyseal bone allografts combined with external and internal pin splintage in small orthopedic surgery. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.20, n.3, p.393-402, 1984.
- BURACCO, P. et al. Pasteurized tumoral autograft as a novel procedure for limb sparing in the dog: a clinical report. **Veterinary Surgery**, v.31, p.525-532, 2002.
- FERREIRA, M.P. et al. Acetabuloplastia extracapsular para o tratamento de displasia coxofemural em cão – relato de caso. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.1, p.101-104, 2007. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/actavet/35-1/artigo713.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2013.
- FERREIRA, M.P. **Comparação de enxerto ósseo cortical autógeno e implante ósseo cortical alógeno liofilizado, congelado a -70°C ou conservado no mel na substituição de segmento diafisário do fêmur de gatos domésticos**. 2008. 139f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- GUITIERRES, M. et al. Substitutos ósseos: conceitos gerais e estado actual. **Arquivos de Medicina**, v.19, n.4, p.153-162, 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.oces.mctes.pt/pdf/am/v19n4/v19n4a04.pdf>>. Acesso em: 21 set. 2013.
- KERWIN, S.C. et al. Bone grafting and banking. **Compendium Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v.13, n.10, p.1558-1566, 1991.
- LaRUE, S.M. et al. Limb-sparing treatment for osteosarcoma in dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.12, n.195, p.1734-1744, 1989.
- MILLIS, D.L.; MARTINEZ, S.A. Bone grafts. In: SLATTER, D. **Textbook of small animal surgery**. 3.ed. Saunders: Philadelphia, 2003. V.2, cap.133, p.1875-1891.
- MORAES, A.M. et al. Criocirurgia com nitrogênio líquido e as dermatoses infecciosas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.83, n.4, p.285-298, 2008.
- MORELLO, E. et al. Bone allografts and adjuvant cisplatin for the treatment of canine appendicular osteosarcoma in 18 dogs. **Journal of Small Animal Practice**, v.42, n.2, p.61-66, 2001.
- PIERMATTEI, D.L.; FLO, G.L. In: \_\_\_\_\_. **Manual de ortopedia e tratamento das fraturas dos pequenos animais**. 3.ed. São Paulo: Manole, 1999. Cap.3, p.139-145.
- PORGEL, M.A. The use of liquid nitrogen cryotherapy in the management of locally aggressive bone lesions. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.51, p.269-273, 1993.
- SILVA, R.B. **Desvitalização extracorporeal de autoenxerto ósseo cortical com nitrogênio líquido – estudo experimental em tíbia de ovelhas**. 2011. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- SINIBALDI, K.R. Evaluation of full cortical allografts in 25 dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.194, n.11, p.1570-1577, 1989.
- STEVENSON, S. et al. The fate of cancellous and cortical bone after transplantation of fresh and frozen tissue-antigen-matched and mismatched osteochondral allografts in dogs. **Journal of Bone and Joint Surgery**, v.73A, p.1143-1156, 1991.
- TANZAWA, Y. et al. Histological examination of frozen autograft treated by liquid nitrogen removed 6 years after implantation. **Journal of Orthopaedic Science**, v.13, p.259-264, 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00776-009-1392-1#page-1>>. Acesso em: 20 set. 2013. doi: 10.1007/s00776-1392-1.
- TSUCHIYA, H. et al. Reconstruction using an autograft containing tumour treated by liquid nitrogen. **Journal of Bone and Joint Surgery (Br)**, v.87B, p.218-225, 2005. Disponível em: <<http://www.bjj.boneandjoint.org.uk/content/87-B/2/218.full>>. Acesso em: 22 set. 2013. doi: 10.1302/0301-620X.87B2.15325.
- TSUCHIYA, H. et al. Pedicle frozen autograft reconstruction in malignant bone tumors. **Journal of Orthopaedic Science**, v.15, p.340-349, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s00776-010-1458-0#page-1>>. Acesso em: 22 set. 2013. doi: 10.1007/s00776-010-1458-0.
- YAMAMOTO, N. et al. Effects of liquid nitrogen treatment on the proliferation of osteosarcoma and the biomechanical properties of normal bone. **Journal of Orthopaedic Science**, v.8, p.374-380, 2003. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10776-002-0626-3#page-1>>. Acesso em: 21 set. 2013. doi: 10.1007/s10776-0020626-3.