



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Faculdade de Medicina Veterinária
Câmpus de Araçatuba

Max Santana Gonzaga

TÉCNICAS DE DESVITALIZAÇÃO EXTRACORPOREA
DE AUTOENXERTO OSSEO NO TRATAMENTO DO
OSTEOSSARCOMA APEDINCULAR

Araçatuba – São Paulo

2017

Max Santana Gonzaga

TÉCNICAS DE DESVITALIZAÇÃO EXTRACORPÓREA
DE AUTOENXERTO OSSEO NO TRATAMENTO DO
OSTEOSSARCOMA APEDINCULAR

Trabalho Científico, como parte do Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Araçatuba, para obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientador: Profº Dr. Francisco Leydson Formiga Feitosa

Araçatuba – São Paulo

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da FMVA / UNESP

G642t Gonzaga, Max Santana
 Técnicas de desvitalização extracorporea de autoenxerto
 ósseo no tratamento do osteossarcoma apendicular / Max
 Santana Gonzaga. – Araçatuba: [s.n.], 2017.
 35f.

 Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade
 Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária de
 Araçatuba.
 Orientador: Prof. Dr. Francisco Leydson Formiga Feitosa

 1. Tumor ósseo 2. Transplante ósseo 3. Esterilização 4.
 Pasteurização 5. Irradiação. I. Título.

CDD 636.0896

ENCAMINHAMENTO

Encaminhamos o presente Trabalho Científico para que a Comissão de Estágios Curriculares tome as providências cabíveis.

Max Santana Gonzaga

Profº. Adjunto III Francisco Leydson Formiga Feitosa

**Araçatuba – São Paulo
Junho de 2017**

DEDICATÓRIA

Dedico à vida, que com seus altos e baixos é capaz de nos conduzir através de aprendizados, agregando experiência, superando obstáculos e nos mostrando a cada dia que somos seres ilimitados e capacitados para a realização de qualquer coisa desde que haja empenho e amor no que seja feito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, meus amigos, professores e orientadores, todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação pessoal e profissional, proporcionando inspiração para almejar meus sonhos e superar qualquer dificuldade.

EPÍGRAFE

“Viva como se fosse morrer amanhã. Aprenda como se fosse viver para
sempre”

– Mahatma Gandhi

TÉCNICAS DE DESVITALIZAÇÃO EXTRACORPÓREA DE AUTOENXERTO OSSEO NO TRATAMENTO DO OSTEOSSARCOMA APEDINCULAR

Max Santana Gonzaga

RESUMO

O osteossarcoma é a neoplasia óssea maligna mais frequentemente diagnosticada, representando cerca de 85% das neoplasias de origem esquelética. A terapêutica comumente indicada é a amputação de membro, seguida da quimioterapia. No entanto, a preservação do membro afetado tem sido utilizada para melhorar a qualidade de vida do animal e é realizada em pacientes com afecções neurológicas, ortopédicas, obesos ou nos casos de proprietários relutantes com a realização da amputação. Diversas técnicas para preservação do membro foram desenvolvidas, cada uma com vantagens únicas e limitações específicas. O objetivo da presente revisão foi de descrever as técnicas de desvitalização extracorpórea de autoenxerto ósseo autoclavado, irradiado, pasteurizado e desvitalizado em nitrogênio líquido, no tratamento do osteossarcoma apendicular, comparando suas vantagens e desvantagens, assim como suas principais complicações.

Palavras chave: Tumor ósseo. Transplante ósseo. Esterilização. Pasteurização. Irradiação.

TECHNIQUES OF ROOT CANAL EXTRACORPOREA OF BONE AUTOGRAFT IN THE TREATMENT OF OSTEOSARCOMA APENDICULAR

Max Santana Gonzaga

SUMMARY

Osteosarcoma is the most frequently diagnosed malignant bone neoplasm, representing about 85% of neoplasms of skeletal origin. The therapy commonly displayed is the amputation of a member, followed by chemotherapy. However, the preservation of the affected limb has been used to improve the quality of life of the animal and is performed in patients with neurological disorders, orthopedic, obese or in the case of reluctant owners with the amputation. Several techniques for preserving the member were developed, each with unique advantages and specific limitations. The objective of this review was to describe the techniques of extracorporeal devitalization of bone autoclave irradiated, pasteurized and devitalized in liquid nitrogen, in the treatment of appendicular osteosarcoma, comparing their advantages and disadvantages, as well as its main complications.

Keywords: Bone tumor. Bone transplantation. Sterilization. Pasteurization. Irradiation.

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Delineamento metodológico, resultados e conclusão dos artigos selecionados para a presente revisão.....	30
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Percentual

CT – Tomografia Computadorizada

Gy – Gray (quantidade de radiação absorvida – 1 Joule por quilograma de matéria)

mm – Milímetros

MRI – Ressonância Magnética

°C – Graus Celsius

RX – Raio - X

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 OSTEOSSARCOMA	12
1.2 PRESERVAÇÃO DO MEMBRO (LIMB SPARING).....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS	16
3. RESULTADOS	16
3.1 ENXERTO AUTOCLAVADO.....	24
3.2 ENXERTO IRRADIADO	25
3.3 ENXERTO PASTEURIZADO	27
3.4 ENXERTO DESVITALIZADO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO	28
4. DISCUSSÃO	30
5. CONCLUSÃO	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

1.1 OSTEOSSARCOMA

O osteossarcoma é um tumor mesenquimal maligno de células ósseas primitivas que histologicamente é composto de células mesenquimais anaplásicas que produzem osteóides. Trata-se de uma neoplasia primária, também conhecida como sarcoma osteogênico, correspondendo a 85% de afecções com origem no esqueleto, que corresponde de 4 a 6% de todos os tumores malignos que acometem os cães (ENDICOTT, 2003).

É a principal neoplasia óssea primária maligna, seguida do condrossarcoma, fibrossarcoma, hemangiossarcoma e tumor multilobar ósseo (CAVALCANTI et al., 2004, GARZOTTO; BERG, 2007). É raro em felídeos, e nestes, são menos agressivos quando comparado aos cães (HELDMANN et al. 2000).

Com relação à distribuição anatômica, em torno de 75% a 85% dos osteossarcomas se desenvolvem no esqueleto apendicular e 25% no esqueleto axial (CAVALCANTI, 2004; LIPTAK et al., 2006).

Frequentemente acomete a região da metáfise de ossos longos como úmero, rádio, ulna, tíbia, fêmur, sendo os locais de maior ocorrência a parte distal do rádio, a proximal do úmero, a distal do fêmur e a proximal da tíbia (ROSENBERG et.al, 2007), tendo maior incidência, portanto, nos membros torácicos.

É classificado pela Organização Mundial de Saúde em forma central e forma periférica (PRÓSPERO, 2001; MEUTEN, 2002). A forma central é classificada nos subtipos osteoblástico, condroblástico, fibroblástico, telangectásico, indiferenciado ou anaplásico, do tipo células gigantes e padrão misto ou com variantes celulares. É a forma clássica mais comum, cresce no interior do osso, rompe a barreira cortical e periosteal, comprimindo as partes moles adjacentes, tornando-se extra-compartimental (PRÓSPERO, 2001; MEUTEN, 2002; WOLFE et al., 2011). Já a forma periférica é classificada em subtipo periosteal, na qual ocorre crescimento na cortical óssea sob o periósteo e não invade o canal medular; e, no subtipo parosteal, com crescimento na superfície óssea sobre a cortical, delimitado por uma linha transparente com largura variável de 1 a 3 mm (PRÓSPERO, 2001; MEUTEN, 2002).

Dentre os sinais clínicos do cão com osteossarcoma apendicular temos a claudicação aguda ou crônica como principal sinal, podendo estar associada ou não

à edema por obstrução tecidual que impede a drenagem linfática normal (KLEINER; SILVA, 2003), a depender do estágio evolutivo da doença, com a presença de impotência funcional do membro. Na forma central, o principal sintoma é a dor intermitente, podendo ocorrer aumento de volume com um tempo variável entre semanas a três meses e, na forma periférica, o aumento de volume é progressivo apresentando dor leve (PRÓSPERO, 2001). Sinais sistêmicos como hipertermia, anorexia ou perda de peso são incomuns no estágio agudo da doença, sendo que, neste estágio, a suspeita de um problema ortopédico não neoplásico leva ao retardo no diagnóstico e terapia da neoplasia (FOSSUM et al., 2001; DALECK et.al, 2002). Em casos avançados, pode-se associar dificuldade respiratória com metástase pulmonar (CAVALCANTI et al.,2004).

O diagnóstico desta neoplasia baseia-se, principalmente, na história clínica, exame físico, exames radiográficos e citológico, sendo a confirmação, muitas vezes, realizada por biópsia e exame histopatológico (DAVIS et.al, 2002).

A aparência radiológica do osteossarcoma pode ser dividida em três categorias: osteolíticas, esclerótica e padrão misto lítico/proliferativo (HOFSTAETTER et al., 2013). Na forma central, ocorre a perda do trabéculo ósseo que é substituído por área de maior densidade podendo ter ou não focos de lise óssea. O desenvolvimento neoplásico atinge a cortical rompendo o perióstio, havendo, então, a formação do triângulo de codman. O crescimento extra-ósseo forma espículas grosseiras ou esporões do tecido ósseo neoformado caracterizando o aspecto em “raios de sol (PRÓSPERO, 2001; NANJI NETO et al., 2007). A forma periférica periosteal apresenta densidade radiográfica semelhante à da cortical do osso em que cresceu, sem comprometimento do canal medular, enquanto que a periférica parosteal forma saliência na superfície cortical do osso, ficando delimitado por uma linha transparente demarcatória (PRÓSPERO, 2001, NANJI NETO et al., 2007). Além da radiografia da porção acometida, deve-se realizar radiografias torácicas à procura de metástase pulmonar (DALECK et al., 2006).

Quando necessário pode ser realizada análises imuno-histoquímica, bioquímica, além de cintilografia óssea, tomografia computadorizada (CT) e ressonância magnética (MRI), onde possibilitam a avaliação da extensão da lesão dentro do osso e a invasão de partes moles (WITTING et al., 2002).

O tratamento pode ser paliativo ou definitivo, visando o controle da dor, sendo esta resultante da ocorrência de microfraturas e/ou devido à interrupção do periósteo induzido pela lise óssea proveniente do desenvolvimento neoplásico (STRAW, 1996).

A tradicional terapêutica de caráter curativo consiste na excisão do osteossarcoma, através da amputação do membro e quimioterapia adjuvante, os quais promovem sobrevida média de 262 a 540 dias nos pacientes que apresentam osteossarcoma apendicular (MACDONALD; SCHILLER, 2010). Como tratamento alternativo à amputação temos a cirurgia de preservação de membro que, quando instituído tratamento quimioterápico semelhante ao instituído na amputação, promovem tempo de sobrevida maior (DAVIS et al., 2002; ENDICOTT, 2003).

1.2 PRESERVAÇÃO DO MEMBRO (LIMB SPARING)

A cirurgia de preservação de membro, denominada de 'limb sparing', tem sido a terapêutica cirúrgica padrão em pacientes humanos nos últimos 15 anos (WALLACK et al., 2002) e consiste na excisão da neoplasia óssea, com auxílio de serra oscilatória, três a cinco centímetros proximais a margem radiográfica do tumor e a reconstrução da coluna óssea e, geralmente, artrodese da articulação adjacente (LIPTAK et al., 2006), permitindo a manutenção do membro sem a presença do estímulo doloroso e sem comprometer a sobrevida do animal (ENDICOTT, 2003). Em todas as técnicas os procedimentos cirúrgicos são delicados, o que requer um grau de conhecimento especializado, assim como o conhecimento das potenciais complicações das mesmas (BURACCO, et al., 2002).

A técnica de preservação do membro é utilizada nos casos em que os animais apresentem alterações neurológicas, afecções ortopédicas, obesidade e, nos casos em que os proprietários não permitem a amputação do mesmo (ENDICOTT, 2003; LIPTAK et al., 2004 b; LIPTAK et al., 2006).

Para que possa ser realizada a preservação do membro o animal deve apresentar, a saber: bom estado de saúde em relação a função cardíaca, renal e da medula óssea, para que possa suportar a cirurgia e a quimioterapia adjuvante. Outros fatores devem ser considerados, tais como ausência de metástase, presença de osteossarcoma que esteja clinicamente e radiograficamente acometendo somente um membro, menos que 50% do comprimento ósseo, e a ausência de fraturas patológicas, pois sua ocorrência favorece a disseminação de células neoplásicas aos

tecidos adjacentes e menos que 360 graus de envolvimento dos tecidos moles adjacentes (STRAW, 1996; DERNELL et al., 2007).

Esta técnica é aplicada com mais frequência em caso de osteossarcoma da extremidade distal do rádio e ulna, pois não é aconselhada em lesões neoplásicas da articulação escapulo-umeral, coxofemoral, e articulação do tarso, devido ao fato de sua imobilização resultar frequentemente em má função do membro e estar associado a um maior número de complicações (ENDICOTT, 2003; LIPTAK et al. 2004a; LIPTAK et al., 2006).

Ressalva-se que a técnica de preservação de membro não altera o tempo de sobrevida quando comparado à amputação e quimioterapia adjuvante, contudo proporciona um excelente retorno à função do membro em 80% dos cães (LIPTAK et al. 2005; MACDONALD; SCHILLER, 2010).

Diversas técnicas para a cirurgia de conservação do membro foram desenvolvidas, cada uma com vantagens únicas e limitações específicas (FOSSUM, 2007). As principais técnicas de desvitalização extracorpórea se dão através de autoenxerto autoclavado (BOHM et al., 1998; HAYASHI et al., 2005), utilização de radioterapia intraoperatória ex vivo (LIPTAK et al., 2004b; BOSTON et al., 2007), autoenxerto pasteurizado (BURACCO et al., 2002; JEON et al 2008), e autoenxerto desvitalizado em nitrogênio líquido (TSUCHIYA et al., 2005; RAHMAN et al, 2009; TSUCHIYA et al., 2010).

As técnicas de desvitalização extracorpórea de autoenxerto ósseo consiste na ressecção em bloco da porção afetada pelo osteossarcoma, garantindo as margens de segurança (BOHM et al. 1998), e por meio de técnicas que utilizam o calor ou o frio, causando a desvitalização de todas as células normais e tumorais daquele segmento, sendo em seguida reimplantado e fixado (LIPTAK et al.,2006).

Os autoenxertos são contraindicados em cães com lesões tumorais primariamente líticas, em que a integridade estrutural do osso cortical pode fragilizar-se ainda mais após o processo de tratamento térmico do enxerto (LIPTAK et al.,2004b). Quando realizados em pacientes com osteossarcoma estes devem passar por uma rigorosa seleção (RAHMAN et al., 2009).

O objetivo da presente revisão foi comparar as técnicas de desvitalização extracorpórea de autoenxerto ósseo na preservação de membro em cães com osteossarcoma apendicular, assim como suas vantagens e desvantagens, tendo em

vista que dentre as técnicas de preservação de membro, são as de mais fácil execução e de menor custo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de uma revisão em que se objetivou analisar as técnicas de desvitalização extracorpórea de autoenxerto ósseo citando suas indicações, como vantagens e desvantagens de cada método assim como suas possíveis complicações. O levantamento bibliográfico foi realizado de janeiro a março de 2017, pelas bases de dados do Pubmed, Periodicos capes, Scielo e Google Acadêmico. As palavras chaves utilizadas para buscar os artigos foram: “desvitalização extracorpórea”, “osteossarcoma canino”, “autoenxerto ósseo”, “autoenxerto pasteurizado”, “autoenxerto autoclavado”, “autoenxerto irradiado” e “nitrogênio líquido”. Por meio de uma breve análise do conteúdo, a partir do resumo e resultados e optando-se por artigos publicados nos últimos 15 anos, foram selecionados 10 trabalhos científicos de base que descrevessem as vantagens e desvantagens de cada técnica utilizada, assim como suas complicações, escritos em língua portuguesa e inglesa, utilizando cães, coelhos e humanos. Outros artigos adicionais e livros de clínica cirúrgica foram utilizados com o intuito de acrescentar conhecimento e aspectos introdutórios a presente pesquisa.

3. RESULTADOS

Foram selecionados 10 artigos que são apresentados na tabela 1, publicados nos últimos 15 anos, e outros artigos foram acrescentados com intuito de agregar conhecimento, descrevendo o delineamento metodológico, resultados e conclusão.

A utilização de autoenxertos ósseos desvitalizados extracorporeamente possuem vantagens em comum entre as técnicas, sendo elas a diminuição da resposta imunológica, a ausência no risco de transmissão de doenças, são economicamente viáveis quando comparadas as outras técnicas, são de fácil acesso e apresentam conformação anatômica compatível com o receptor (BURACCO et al. 2002, TSUCHIYA et al., 2010).

Dentre as desvantagens ressalta-se que sua utilização não é recomendada quando o padrão do tumor for severamente lítico (BOSTON et al., 2007), o impedimento da posterior análise histológica das margens de segurança do segmento

removido, tendo em vista que o mesmo é reimplantado, o que poderia interferir na escolha do protocolo quimioterápico mais adequado (RAHMAN et al., 2009).

Para que seja compreendida as vantagens e desvantagens de cada técnica, se faz necessário que a definição do potencial osteoindutor e osteocondutor seja esclarecida. O potencial osteoindutor é a capacidade que o enxerto possui em induzir células mesenquimais do hospedeiro a se transformar em osteoblastos (SILVIA et al., 2000). Já o potencial osteocondutor é a capacidade de intracrescimento dos capilares em processo de brotamento do tecido perivascular e das células osteoprogenitoras do leito recipiente dentro do enxerto (STEVENSON, 1998).

Tabela 1. Delineamento metodológico, resultados e conclusão dos artigos selecionados para a presente revisão.

Autor	Espécie	Delineamento Metodológico	Resultados	Conclusão
MORELLO et al. (2003)	Canina	Para o procedimento de preservação de membro foi utilizado um autoenxerto do segmento tumoral excisado, pasteurizado a 65 ° C durante 40 minutos. A quimioterapia adjuvante (cisplatina ou cisplatina e doxorubicina) foi administrada em todos os cães.	Os tempos de sobrevivência médios e médios foram de 531 e 324 dias, respectivamente (intervalo, 180 a 1.868 dias). A sobrevivência global foi de 100% aos 6 meses, 50% aos 12 meses, 44% aos 18 meses e 22% aos 24 meses. Metástase pulmonar ocorreu em 5 (38%) cães. As complicações observadas foram recorrência local (2 cães, 15%), infecção por aloenxerto (4 cães, 31%) e falência do implante (3 cães, 23%). A função dos membros foi boa em 12 cães (92%) e justo em 1 cão.	O autoenxerto ósseo pasteurizado derivado do segmento ósseo tumoral foi uma alternativa efetiva ao aloenxerto de ossos corticais para os membros que pouparam no osteossarcoma radial distal canino, em termos de viabilidade, padrão de cura, complicações e sobrevivência
BOSTON et al. (2007)	Canina	Um segmento ósseo contendo o tumor foi isolado cirurgicamente, tratado por IORT, reimplantado e protegido por fixação interna. Em 1 cão, o leito tumoral postradição foi cureto e cheio de cimento ósseo. Os cães foram administrados alternando adriamicina e carboplatina a partir de 2 semanas após o IORT e monitorados em intervalos regulares.	Quatro cães tiveram osteossarcoma e 1 apresentaram sarcoma indiferenciado. A falha do implante (n°/43), a infecção do tecido profundo (3) e a fratura patológica (3) resultaram em amputação (3) ou em pancarpação (2). O cão com sarcoma indiferenciado foi eutanizado devido a suspeita de recorrência tumoral 4 meses pós-operatório. A cura da osteotomia foi documentada por radiografia (1), histopatologia (2), ou por observação direta (2).	As vantagens incluem cicatrização do auto-enxerto e fonte para um autoenxerto perfeitamente adequado, mas não parece oferecer nenhuma vantagem em relação à taxa de infecção. A preservação a longo prazo da articulação radiocarpática não foi bem sucedida.

<p>RAHMAN N et al. (2009)</p>	<p>Humana</p>	<p>Participaram dez pacientes com osteossarcoma em torno do joelho, com idade média de 21 anos. A técnica operatória incluiu excisão em bloco, desbridamento e manejo do segmento ressecado com nitrogênio líquido seguido de reimplante e fixação interna. Em um tempo médio de 4,5 anos, não houve recidiva local ou sistêmica e o escore funcional médio foi de 82,4%.</p>	<p>Em um seguimento médio de 4,5 anos, não houve recidiva local ou sistêmica e o escore funcional médio foi de 82,4%. O enxerto congelado uniu-se proximalmente e distalmente em todos, exceto um paciente, em um período que varia de seis a dez meses.</p>	<p>A eficácia desta técnica de reconstrução em pacientes com resposta seletiva adequada é comparável a outras técnicas de reconstrução biológica com o benefício adicional de ser simples, barato e durável.</p>
<p>TANZAWA et. al (2009)</p>	<p>Humana</p>	<p>Analisamos autoenxertos congelados tratados com nitrogênio líquido, recuperados em média de 19,1 meses (2-75 meses) após implantação por complicações ou recorrência tumoral local. Os espécimes foram obtidos de seis pacientes com idade média de 36,2 anos (8-68 anos). Os seis enxertos compreendiam três enxertos osteoarticulares, dois enxertos intercalares</p>	<p>As células tumorais foram completamente erradicadas do osso congelado em todos os casos. Num espécime recuperado 5 meses após a implantação, uma pequena área do osso apresentou osteócitos ativos e osteoblastos. Em três casos recuperados mais de 1 ano após a implantação, osteócitos e osteoblastos foram observados em grandes porções dos ossos congelados, indicando o início da osteogênese no osso congelado em estágio inicial. A junção cortical do hospedeiro-enxerto mostrou incorporação juntamente com</p>	<p>Os espécimes de osso congelados neste estudo mostraram evidências de ossos recentemente formados e osteogênese anterior do que já foi relatado anteriormente. Nossos resultados sugerem que autoenxertos congelados podem ser considerados um dos materiais recicláveis mais úteis para a</p>

		e um enxerto de união. Analisamos histologicamente as seções contendo autografamentos para necrose de células tumorais, evidências de reparo cortical, junção cortical e cartilagem articular.	a continuidade das trabéculas ósseas. Além disso, conseguimos encontrar condrócitos normais na superfície articular	reconstrução biológica.
VURAL et al. (2010)	Coelhos	Vinte e cinco coelhos machos adultos foram incluídos no estudo; Todos os 25 tiveram os blocos ósseos ressecados e reimplantados. No grupo 1, os blocos ósseos foram autoclavados; No grupo 2, os blocos ósseos foram pasteurizados; E no grupo 3 (controles), os blocos ósseos ressecados foram reimplantados sem esterilização	As pontuações de Heiple das partes proximais das superfícies de fusão no grupo 1, grupo 2 e grupo 3 foram $12,8 \pm 0,4$, $6,8 \pm 1,2$ e $10,2 \pm 1,9$, respectivamente. As pontuações Heiple das partes distal das superfícies de fusão no grupo 1, grupo 2 e grupo 3 foram $10,8 \pm 0,8$, $6,0 \pm 1,1$ e $9,8 \pm 1,5$, respectivamente. As diferenças nos escores radiológicos não foram estatisticamente significativas entre os grupos para superfícies de fusão proximal ou distal em 3 e 6 semanas.	A pasteurização tem um efeito menos negativo na cicatrização óssea do que na autoclavagem e pode ser considerada para esterilização óssea em certas circunstâncias.
TSUCHIYA et al. (2010)	Humana	Foram tratados 33 pacientes com tumores malignos osseos. Os diagnósticos dos tumores foram 17 osteossarcomas, 11 tumores metastáticos, 2 sarcomas de Ewing, 2 condrossarcomas e 1 sarcoma pleomórfico	A função pós-operatória foi excelente em 25 pacientes (75,7%), boa em 5 pacientes (15,1%) e justa em 3 pacientes (9,0%). No seguimento final, 8 pacientes morreram na média de 17 meses pós-operatório, e 18 pacientes permaneceram isentos de doença para um período médio de seguimento de 30 meses (intervalo de 7 a	O autoenxerto congelado de pedículo, que foi recentemente desenvolvido para resolver desvantagens de autoenxertos congelados livres previamente relatados, obteve sucesso na

		<p>indiferenciado. Os locais dos tumores foram 23 fêmures, 5 tíbias, 4 humeri e 1 calcâneo. Os procedimentos operacionais consistiram em expor o tumor, realizar uma osteotomia no local ou dislocação das articulações, girando e congelando a lesão do tumor em nitrogênio líquido durante 20 minutos e reconstrução usando pregas intramedulares, placas ou artroplastia composta.</p>	<p>69 meses). Sete pacientes estavam vivos, mas com doença. As complicações foram encontradas em 12 pacientes, incluindo 4 infecções profundas, 3 fraturas, 3 recidivas locais dos tecidos moles circundantes, 2 não uniões e 1 colapso. Todos foram gerenciados com sucesso.</p>	<p>reconstrução de tumores de osso malignos. Esta é uma técnica cirúrgica nova, simples e eficaz para a reconstrução biológica que ainda é investigada, mas tem potencial para o desenvolvimento.</p>
SIGN et al. (2010)	Humana	<p>Avaliar o efeito de vários métodos de esterilização no comportamento mecânico do enxerto ósseo cortical humano e avaliação histopatológica de amostras de ossos tumorais após serem processados com 4 métodos diferentes de esterilização. O osso tumoral cortical humano fresco é colhido da região diafisária do osso tumoral foram esterilizados por</p>	<p>A análise da ANOVA do "esforço de falha", do "módulo" e da "tensão para a falha" demonstrou diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o osso cortical tratado e os espécimes não tratados sob carga mecânica. O "estresse ao fracasso" foi significativamente reduzido nas amostras de ossos corticais cozidos, autoclavados e irradiados ($p < 0,05$). 'Modulus' detectou diferenças significativas nos espécimes cozidos, autoclavados e de pasteurização em relação aos controles ($p < 0,05$). A "tensão</p>	<p>Esterilização da amostra de osso cortical por pasteurização e, em menor grau, a irradiação não altera significativamente as propriedades mecânicas quando comparadas com amostras não tratadas. As propriedades mecânicas degradam-se com o uso de altas temperaturas para esterilização (ferver). Todos os</p>

		<p>autoclave (n = 10); Ferver (n = 10); Pasteurização (n = 10); E irradiação (n = 10). Havia também 10 espécimes de controle que não receberam nenhuma forma de tratamento de esterilização. O teste biomecânico realizado foi o estresse para a falha, o módulo e a tensão para a falha, que foram determinados a partir de testes de compressão axial. A análise estatística (ANOVA) foi realizada nesses resultados. O nível de significância (a) e a potência (b) foram ajustados para 0,05 e 0,90, respectivamente.</p>	<p>ao fracasso" foi reduzida por irradiação ($p < 0,05$), mas não pelos outros três métodos de tratamentos. O estudo de histopatologia não revelou célula de tumor viável em nenhum dos quatro tipos de grupo de tratamento em comparação com o grupo de controle não tratado.</p>	<p>métodos de esterilização deram origem a 100% de morte tumoral.</p>
ROCHA et al. (2013)	Canina	<p>Utilizados dois cães machos da raça Rottweiler que foram diagnosticados com osteossarcoma apendicular, optando-se pelo tratamento cirúrgico preservador do membro, utilizando-se a desvitalização extracorporea por enxerto autoclavado e</p>	<p>Nas avaliações pós-operatórias, menores complicações e um apoio mais precoce do membro foram observados no paciente submetido à técnica de congelamento. O paciente tratado com autoenxerto autoclavado apresentou pobre função motora do membro, com reabsorção do fragmento ósseo no 5º mês pós-cirúrgico.</p>	<p>O autoenxerto ósseo submetido à desvitalização por nitrogênio líquido obteve melhores resultados na cirurgia preservadora do membro em cães com osteossarcoma.</p>

		pela desvitalização por nitrogênio líquido.		
YASIN et al. (2015)	Coelho	<p>O osso cortical do coelho fresco foi colhido da diálise tibial e esterilizado extracorpóreamente por pasteurização (n = 6), autoclave (n = 6), irradiação (n = 6) e solução salina normal como grupo controle (n = 6). Os ossos corticais foram imediatamente reimplantados após o processo de esterilização. O processo subsequente de incorporação de enxerto foi examinado ao longo de um período de 12 semanas por radiografia em série, avaliações biomecânicas e histopatológicas. A análise estatística (ANOVA) foi realizada nesses resultados. O nível de significância</p>	<p>A análise radiográfica mostrou que o grupo de irradiação tem maior pontuação em união óssea em comparação com outros grupos de esterilização (p = 0,041). A análise da ANOVA do "estresse de falha", "módulo" e "tensão para falir" não demonstrou diferenças significativas (p = 0,389) entre os tratos e as amostras não tratadas sob carga mecânica. Na análise histopatológica macroscópica, o grupo irradiado possui a maior porcentagem de união óssea (91,7%). No entanto, na análise microscópica da união, o grupo de pasteurização tem pontuação significativamente maior (p = 0,041) na formação do calo, porcentagem de ostocitos e clareza da medula óssea no final do estudo, indicando o bom potencial de união</p>	<p>Ambas as técnicas de irradiação e pasteurização têm um desfecho favorável em termos de união óssea baseada em avaliações radiográficas e histopatológicas. O autoclave tem o pior resultado. Estes resultados indicam que a irradiação extracorpórea da pasteurização de autoenxertos ósseos são uma opção viável. No entanto, a pasteurização tem os melhores resultados globais devido à preservação dos osteócitos e à celularidade da medula óssea</p>

		(a) e a potência (b) foram ajustados para 0,05 e 0,90, respectivamente		
Dal-bó e FERRIGNO et al. (2016)	Canina	Os animais foram distribuídos aleatoriamente: para cada cadáver, foi realizado sorteio, que determinou o tratamento (autoclavagem ou desvitalização em nitrogênio líquido) e qual lado seria submetido a ele. Cada par de raios pertencia a um tratamento, sendo um lado tratado e o contralateral o seu controle. Obtiveram-se quatro grupos, cada um composto por 10 raios: grupo autoclave (GA), grupo controle autoclave (GCA), grupo nitrogênio (GN) e grupo controle nitrogênio (GCN).	Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos GA e GCA somente na comparação da variável força máxima. A análise das variáveis tensão-tração, tensão-compressão e tensão máxima evidenciou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos GA e GN, sendo os valores maiores para o grupo GA. Também foi realizada comparação entre os deltas (GN menos GCN e GA menos GCA), em que não foram observadas diferenças estatísticas.	Ambos os métodos podem ser utilizados para o tratamento de autoenxertos para a cirurgia de preservação do membro, sem prejuízo quanto à resistência biomecânica

3.1 ENXERTO AUTOCLAVADO

O autoenxerto autoclavado é utilizado na preservação de membro em humanos (PAN et al., 2012) e em cães (FERRIGNO, 2011) e há relatos de aplicações clínicas do mesmo para reconstrução de defeitos ósseos desde 1956 (HAYASHI et al., 2005).

Sua técnica consiste na excisão da porção óssea acometida, garantindo suas margens de segurança, que é autoclavada por um tempo de 15 minutos a 134°C ou 20 minutos a 120°C, para ossos longos, com a intenção de desvitalizar suas células tumorais. Há a necessidade de rigoroso controle das condições de temperatura além de aparelhagem específica para tal (BOHM et al., 1998; ROCHA et al., 2013).

Ferrigno (2011), utilizou a técnica em 10 cães acometidos por osteossarcoma, concluindo que a mesma é possível de ser realizada e, permite tempo de sobrevida semelhante a outras técnicas de preservação de membro, que foi de 271 dias, em média.

Nos tratamentos térmicos não há a preservação das propriedades biológicas do fragmento ósseo, sendo que o processo de autoclavagem leva a perda da matriz cartilaginosa (HAYASHI et al., 2005), desgaste do fragmento ósseo com acentuada redução da sua espessura (ROCHA et al., 2013), diminuição do potencial osteoindutor pela desnaturação de proteínas pelo calor, sendo mantido somente seu potencial osteocondutor, ou seja, sua função estrutural (figura 1). Qualquer falha durante o processo pode resultar em um fragmento ósseo frágil que apresente menor resistência em testes biomecânicos (BOHM et al., 1998; HAYASHI et al., 2005; TSUCHIYA et al., 2005; TANZAWA et al., 2009, KAWANO et al., 2010).

Corroborando, Rocha et al. (2013) observaram, após o processo de autoclavagem, pobre função motora do membro, com complicações pós-cirúrgicas mais graves, culminando no sequestro do enxerto autoclavado no 5º mês pós cirúrgico.

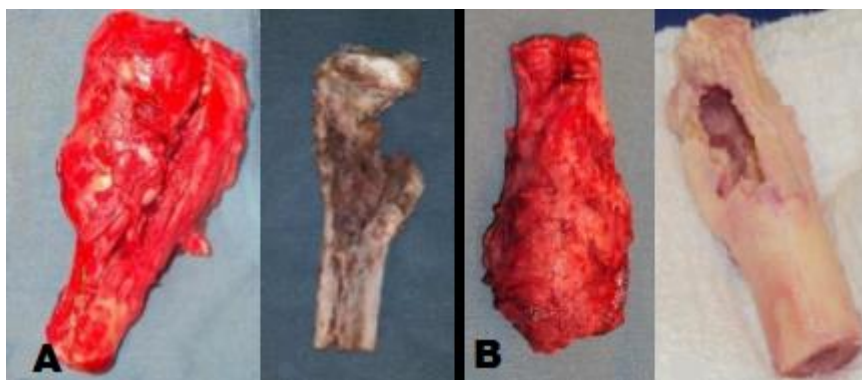


Figura 1. Fragmento ósseo da porção distal do rádio com osteossarcoma. A) Após a devitalização extracorpórea por autoclavagem. B) Após a devitalização extracorpórea por nitrogênio líquido. Fonte: ROCHA et al., 2013.

3.2 ENXERTO IRRADIADO

Desde 1978 tem se utilizado a radiação intraoperatória para o tratamento de osteossarcoma em humanos, sendo a primeira modalidade estabelecida de tratamento local de tumores avançados (ABE et al., 1980). A radiação intraoperatória pode ser empregada in vivo (figura 2) ou ex vivo. A técnica ex vivo ou radiação intraoperatória extracorpórea é uma modificação da técnica in vivo e consiste na aplicação de radiação em doses variáveis, sendo o Gray (Gy) a unidade de dose absorvida.

Sua técnica consiste na remoção do segmento ósseo acometido pela neoplasia, o mesmo é colocado em embalagem plástica estéril e tratado com radiação a uma dose única de 70 gray (Gy) e 6 megavolts (MV) de fótons e, posteriormente reposicionado e fixado (LIPTAK et al., 2004b). Esta é a dose adequada à destruição tanto de células normais quanto de células neoplásicas e, é equivalente a 2-4 vezes a mesma dose administrada usando protocolos de radiação fracionada (BOSTON et al., 2007), sendo que 50 gray já é uma dose tumoricida a tumores ósseos resultando em necrose completa das lesões (YAMAMURO et al., 1989).

Esta técnica é indicada para casos de osteossarcoma com lise óssea diminuta, reduzido envolvimento dos tecidos neoplásicos e dos tecidos moles adjacentes, assim como o não envolvimento da ulna. Para que ocorra a adequada revascularização do segmento ósseo, se faz necessário a cobertura por tecidos moles viáveis o que

justifica a preferida localização da neoplasia na extremidade proximal ou na metáfise (LIPTAK et al., 2004b; BOSTON et al., 2007)

Como desvantagens temos a modificação dos elementos celulares e vasculares levando à osteopenia e diminuição da resistência mecânica, aumentando o risco de fraturas patológicas e falhas de implantes (LIPTAK et al., 2004b, BOSTON et al., 2007). Dentre as alterações vasculares temos: a ocorrência de endoarterites e periarterites, edema e vacuolização endotelial que causam estreitamento da luz dos vasos e diminuição do volume sanguíneo e conseqüentemente, hipóxia (LIPTAK et al., 2004b).

No estudo realizado por Boston et al. (2007), foi utilizada a dose de 70 Gy de radiação em cinco cães com osteossarcoma de rádio distal, e dentre as complicações relatadas, o desenvolvimento de fratura patológica foi a mais frequente, além de falha de implante e revisão cirúrgica com artrodese pancarpal, devido à ocorrência de infecção profunda em três casos. A fratura patológica se deu pela lise provocada pelo tumor em conjunto com a necrose causada pela radiação. Embora esta técnica tenha sido instituída com um sucesso comparável ao de outras técnicas, noutras localizações e num número restrito, a maior parte dos animais (69% a 100%) desenvolveu complicações graves (LIPTAK et al., 2004b; BOSTON et al., 2007). No futuro, só o aperfeiçoamento desta técnica e a realização de estudos mais pormenorizados, poderão corroborar a sua recomendação.

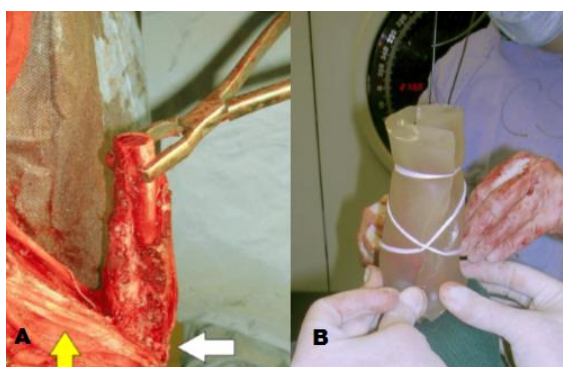


Figura 2. Irradiação intraoperatória in vivo. A) O aspecto distal do rádio é liberado de seus anexos de partes moles e a osteotomia realizada no rádio. O rádio é girado cranialmente ao redor do carpo, longe dos tecidos moles circundantes (seta amarela, tendões, seta branca, articulação radiocarpiana). B) Após o paciente ter sido transportado para a suíte de radiação, a parte distal do rádio é pendurado e o rádio exposto é envolvido em 1,5 centímetros de bolus de tecido esterilizado por plasma fixado por fita umbilical estéril. Fonte: BOSTON et al., 2007.

3.3 ENXERTO PASTEURIZADO

A técnica de autoenxerto pasteurizado consiste na remoção do segmento ósseo com uma ostectomia com 3 a 4 centímetros de margem de segurança, com subsequente preparo e remoção de tecidos moles. Em seguida, o mesmo é colocado em um recipiente impermeável à água, contendo solução de cloreto de sódio (NaCl) a 0,9%, pré-aquecido a 65° C permanecendo em banho maria por 40 minutos, seguida da sua reimplantação e fixação com placa de compressão dinâmica (BURACCO et al., 2002; MORELLO et al. 2003; DERNELL et al., 2007).

As desvantagens dessa técnica são semelhantes às da técnica de aloenxertos, no que diz respeito à ocorrência de infecção (31%), recidiva neoplásica (15%) e falha ortopédica do implante (23%) (BURACCO et al., 2002; MORELLO et al., 2003). A extensa lise óssea na porção do osso neoplásico pasteurizado, poderá restringir a fixação de número suficiente de parafusos (Figura 3), conferindo desvantagem a esta técnica, pois determina uma menor resistência as forças de tração (BURACCO et al., 2002).

Buracco et al. (2002) descreveram um caso de um canino com osteossarcoma de rádio distal e, apesar de algumas complicações como afrouxamento de parafusos e tratos drenantes, obteve sobrevida de 56 meses.

Já Morello et al. (2003) obtiveram, com o tratamento de autoenxerto pasteurizado com quimioterapia adjuvante em 13 casos, uma taxa de sobrevida global de 100% aos 6 meses, 50% aos 12 meses, 44% aos 18 meses e 22% aos 24 meses. Metástase pulmonar ocorreu em 5 (38%) cães. As complicações observadas foram recorrência local (2 cães, 15%), infecção por aloenxerto (4 cães, 31%) e falência do implante (3 cães, 23%). A função dos membros foi boa em 12 cães (92%)



Figura 3. Projeção lateral, 6 meses após a cirurgia. Houve a necessidade de remoção de um parafuso e substituição de 3 para manter a estabilidade. Alterações líticas compatíveis com a infecção são evidentes na ulna. Fonte: BURACCO, et al., 2002.

3.4 ENXERTO DESVITALIZADO EM NITROGÊNIO LÍQUIDO

Há relatos da utilização da crioterapia como uma forma de destruir tecidos tumorais, com a redução da dor e da hemorragia local, referenciadas entre 1819 e 1879 (COOPER; DAWBER, 2001). Contudo, o uso do nitrogênio líquido para tratamento de osteossarcoma primário foi descrito pela primeira vez em 1984 (RAHMAN et al., 2009). O nitrogênio líquido, armazenado a -197°C , é agente criogênico eficaz, que pode ser utilizado para preservação ou destruição tecidual. O congelamento lento e descongelamento rápido permitem a preservação dos tecidos, enquanto o rápido congelamento e descongelamento lento causam destruição celular (RAHMAN et al., 2009).

Sua técnica de desvitalização consiste em submergir a porção neoplásica em um recipiente contendo nitrogênio líquido a -196°C durante 20 minutos, seguido por descongelamento em temperatura ambiente por 15 minutos e submersão em água destilada por 10 minutos (TSUCHIYA et al, 2005; TSUCHIYA et.al, 2010).

Quanto a técnica de preservação de membro, realizada por meio do nitrogênio líquido, há três classificações da mesma. O tipo 1 é o protocolo mais utilizado e consiste na excisão em excisão em bloco da neoplasia, remoção dos tecidos moles adjacentes (Figura 4a), realizada a técnica acima descrita e posterior reimplantação

da porção desvitalizada através de fixação interna (NISHIDA et. al, 2008). O tipo 2 consiste na excisão intercalar, ou seja, compreende dois segmentos periarticulares, que serão juntamente desvitalizados (Figura 4b) e posteriormente fixados (ZERKRY et al., 2017). O tipo 3 consiste no congelamento *in situ* da lesão após osteotomia que irá criar um pedículo, e o mesmo será submergido (TSUCHIYA et.al, 2005; TSUCHIYA et.al, 2010). Esta última, por não se tratar de uma desvitalização extracorpórea, não será elucidada suas vantagens em relação as duas outras técnicas aqui descritas. Rahman et al. (2009) relata que na técnica excisional houve adequada funcionabilidade do membro, com mínimas complicações, porém os autores sugerem que devam ser realizados estudos a longo prazo, além da seleção criteriosa de pacientes.

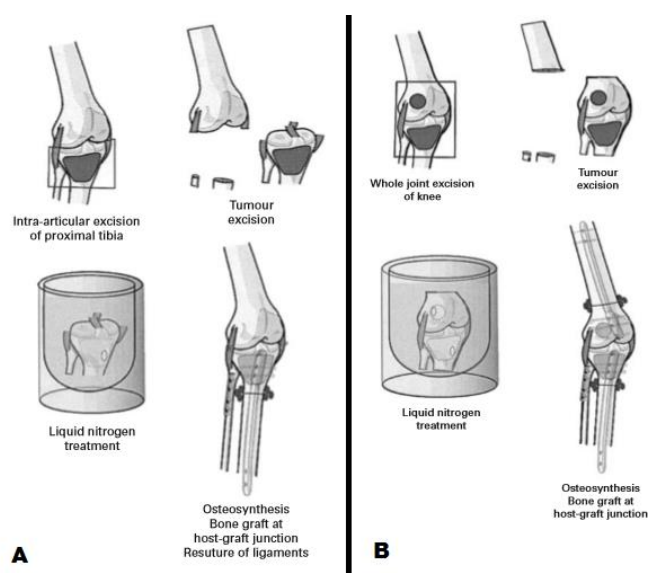


Figura 4. Técnicas de desvitalização por nitrogênio líquido. A) Reconstrução do tipo 1. B) Reconstrução do tipo 2. Fonte: TSUCHIYA et al., 2005.

Independente da técnica realizada, é preconizado a remoção dos tecidos moles para obtenção de margem de segurança e curetagem do canal medular, para evitar fratura óssea devido à expansão no congelamento (TSUCHIYA et al., 2010).

Dentre as vantagens da utilização do nitrogênio líquido para a desvitalização citam-se a simplicidade de aplicação da técnica, baixo custo, manutenção das propriedades de osteoindução e osteocondução, reduzido período trans-operatório, preservação da matriz da cartilagem, resistência biomecânica suficiente (TSUCHIYA et al., 2005; KAWANO et al., 2010), fácil fixação dos tendões e ligamentos,

revascularização do enxerto, sem necessidade de equipamentos especializados, não desnatura proteínas (KAWANO et al., 2010) e promove revitalização precoce e efeitos criomunológicos (TANZAWA et al., 2009; TSUCHIYA et al., 2010)

Zerkry et al. (2017) obtiveram como resultado a consolidação completa em 97% dos pacientes, havendo 5 casos de não união, seis casos de fratura, dois casos de infecção profunda e quatro casos de recorrência local.

A hipotermia não apenas induz a morte de células tumorais, mas também ativa a resposta imune antitumoral estimulada pelos antígenos tumorais liberados pelo tecido crionecrótico (NISHIDA et al., 2008) e a hipótese de tal ocorrência se dá pela ruptura da membrana celular devido ao congelamento levando à liberação de antígenos suficientes para induzir a formação de anticorpos (GAGE et al., 2009).

4. DISCUSSÃO

A força do enxerto vai depender da integridade biológica das estruturas restantes após o tratamento de desvitalização extracorpórea (TSUCHIYA et al., 2010), que será diferente de acordo com as características da técnica utilizada.

Morello et al. (2003) em seu estudo clínico prospectivo concluíram que autoenxerto ósseo tumoral pasteurizado foi uma alternativa efetiva ao aloenxerto de ossos corticais na preservação de membro em cães com osteossarcoma em rádio distal, em termos de viabilidade, padrão de cura, complicações e sobrevivência.

Ao se comparar o processo de autoclavagem e pasteurização, Vural et al. (2010) concluíram que a pasteurização tem um efeito menos negativo na cicatrização óssea do que a autoclavagem, podendo ser considerada como método para a esterilização óssea em certas circunstâncias.

Entre os métodos de pasteurização e irradiação, Singh et al. (2010) concluíram que a esterilização por pasteurização e, em menor extensão, a irradiação gama, não ocorre alteração das propriedades mecânicas quando comparada com as amostras não tratadas. Entretanto, houve prejuízo das propriedades mecânicas e diminuição da resistência dos corpos de prova diretamente proporcional ao aumento de temperatura.

Boston et al. (2007) concluíram que a utilização da radioterapia intraoperatória teve vantagens que incluem cicatrização do autoenxerto e fonte para um autoenxerto perfeito, todavia não parece oferecer qualquer vantagem em relação à taxa de infecção.

Yasin et al. (2015) demonstraram que a pasteurização tem a maior pontuação na análise histopatológica microscópica, o que a torna superior à radiação. Os enxertos desvitalizados seja por autoclavagem, pasteurização ou irradiação serão dramaticamente enfraquecidos biomecanicamente ao longo do tempo. Embora os métodos de irradiação e pasteurização ofereçam uma maneira simples de esterilizar os autoenxertos ósseos, a pasteurização oferece o melhor resultado geral e pode ser uma opção útil para reconstruir um defeito ósseo maior depois da ressecção do tumor.

TANZAWA et al. (2009) deixaram de usar osso autoclavado para a reconstrução de ressecções tumorais, devido a perda da força dinâmica do osso tratado com altas temperaturas (130°C). Passaram a utilizar a técnica de congelamento de autoenxerto por nitrogênio líquido devido as suas vantagens, como simplicidade no manuseio, osteoindução, osteocondução, tempo curto de tratamento, preservação da matriz cartilaginosa, ajuste adequado ao leito receptor, força biomecânica suficiente, desejável reserva de osso e devido ao fato de não necessitar de uma formação de banco de ossos. Corroborando, Rocha et al. (2013) concluíram que o autoenxerto ósseo desvitalizado em nitrogênio líquido obteve melhores resultados quando comparado aos autoclavados na cirurgia preservadora do membro em cães com osteossarcoma.

Entretanto, Dal- bó e Ferrigno et al. (2016), concluíram que ambos os métodos, autoclavagem e nitrogênio líquido, podem ser utilizados para o tratamento de autoenxertos para a cirurgia de preservação do membro, sem prejuízo quanto à resistência biomecânica. Tal fato sugere que o fator determinante para que haja sucesso no método escolhido seja a seleção criteriosa do paciente (RAHMANN et al., 2009; Vural et al., 2010), assim como a aplicabilidade da melhor técnica para cada caso.

5. CONCLUSÃO

É possível afirmar que:

- 1) Todas as técnicas de desvitalização extracorpórea de autoenxerto ósseo no tratamento do osteossarcoma apendicular podem ser realizadas com êxito, desde que haja criteriosa seleção do paciente, assim como a melhor técnica a ser utilizada para cada, de acordo com as características tumorais.
- 2) A técnica que mais se destaca é a de desvitalização por nitrogênio líquido por proporcionar: adequada funcionalidade do membro com mínimas

complicações, pela manutenção das propriedades de osteoindução e osteocondução e, desencadear ativação da resposta imune antitumoral. Além do que, possui menor custo por não necessitar de aparelhagem específica sendo sua técnica de fácil realização.

- 3) Outrossim, mais estudos correlacionando as características tumorais, assim como suas localizações, são necessários, visando estabelecer a melhor técnica para cada, minimizando, com isso, o vasto leque de complicações associadas às diferentes abordagens.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE M.; TAKAHASHI M.; YABUMOTO E.; ADACHI H.; YOSHII M.; MORI, K. Clinical experiences with intraoperative radiotherapy of locally advanced cancers. *Cancer* v.45, p.40–48, 1980.

BOHM, P.; SPRINGFELD, R.; SPRINGER, H. Re-implantation of autoclaved bone segments in musculoskeletal tumor surgery. Clinical experience in 9 patients followed for 1.1 – 8.4 years and review of the literature. *Archives of Orthopaedics and Trauma Surgery*, v. 118, p. 57-65, 1998.

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*. v. 36, p. 314-232, 2007.

BURACCO, P.; MORELLO, E.; MARTANO, M.; VASCONI, M. E. Pasteurized tumoral autograft as a novel procedure for a limb sparing in the dog: a clinical report. *Veterinary Surgery*, v. 31, p. 525-532, 2002.

CAVALCANTI, J.N. et al. Osteosarcoma in dogs: clinical-morphological study and prognostic correlation. *Braz. J. Vet. Res. Animal. Science.*, v.24, p.299-305, 2004.

COOPER, S.M.; DAWBER, R.P.R. The history of cryosurgery. *Journal of the royal society of medicine*. v.94, p. 196-201, 2001.

DAL-BÓ, Í.S.; FERRIGNO, C.R. A.; PEREIRA, C.A.M. Estudo biomecânico comparativo da resistência de segmentos ósseos de raios de cães autoclavados ou desvitalizados em nitrogênio líquido. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.68, n.3, p.673-682, 2016.

DALECK, C.R.; FONSECA, C.S.; CANOLA, J.L. Osteossarcoma canino revisão. *Revista de Educação continuada do CRMV/SP*. v.5(3), p. 233-242, 2002.

DALECK, C.R.; CANOLA, J.C.; STEFANES, S.A.; SHOCKEN, P.F.L.; DE NARDI, A.B. Estudo retrospectivo de osteossarcoma primário dos ossos da pelve em cães em um período de 14 meses. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. v.43, n.1, p.125-131, 2006.

DAVIS, G.J.; KAPATKIN, A.S.; CRAIG, L.E.; HEINS, G.S. & WORTMAN, J.A. Comparison of radiography, computed tomography, and magnetic resonance imaging for evaluation of appendicular osteosarcoma in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v.220(8), p. 1171-1176, 2002.

DERNELLI, W.S.; et al. Tumors of the skeletal system. In S.J. Withrow and E.G. MacEwen, *Small Animal Oncology*. p.540-561, USA: Elsevier (4th Ed.), 2007.

ENDICOTT, M. Principles of treatment for osteosarcoma. *Clin. Tech. Small. Anim. Pract.* v.18, n.2, p.110-114, 2003.

FERRIGNO, C.R.A. Tratamento de neoplasias ósseas apendiculares com reimplantação de enxerto ósseo autólogo autoclavado associado ao plasma rico em plaquetas: estudo crítico na cirurgia de preservação de membro em cães. Tese de Livre Docência. São Paulo: USP, 2011.

FOSSUM, T.W.; et al. Outras doenças ósseas e articulares. In: Fossum T.W. (Ed). *Cirurgia de Pequenos Animais*. São Paulo: Roca, pp.1115-1137, 2001.

GAGE, A.A.; BAUST, J.M.; BAUST, J.G. Experimental cryosurgery investigations in vivo. *Cryobiology*. v.59, n.3, p. 1-31, 2009.

GARZOTTO, C.; BERG, J. Sistema musculoesquelético. In: SLATTER, D. Manual de cirurgia de pequenos animais. Barueri: Manole, p.2460-2474, 2007.

HAYASHI, K.; TSUCHIYA, H.; YAMAMOTO, N.; MINATO, H.; TOMITA, K. Histological examination of autoclaved bone removed 12 years after it was transplanted. *Journal of Orthopaedic Science*, v. 10, p. 425-429, 2005.

HELDMANN, E.; ANDERSON, M.A.; WAGNER-MANN, C. Feline Osteosarcoma: 145 Cases (1990–1995). *JOURNAL of the American Animal Hospital Association*, v.36, p 518-521, 2000.

HOFSTAETTER, J.G.; ROSCHGER, A.; PUCHNER, S.; DOMINKUS, M.; SULZBACHER, I.; WINDHAGER, R.; KLAUSHOFER, K.; ROSCHGER, P. Altered matrix mineralization in a case of a sclerosing osteosarcoma. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2012.12.043>, 2013.

JEON, D.; KIM, M.S.; CHO, W.H.; SONG, W.S.; LEE, S. Reconstruction with pasteurized autograft for distal tibia tumor. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, v. 128, p. 159-165, 2008.

KAWANO M.; NISHIDA, H.; NAKAMOTO, Y.; TSUMURA, H.; TSUCHIYA, H. Cryoimmunologic antitumor effects enhanced by dendritic cells in osteosarcoma. *Clin Orthop Relat Res*. v.468, p.1373–83, 2010.

KLEINER, J.A.; SILVA, E.G. Tumores ósseos em pequenos animais. *Med Vep*, v.1, n3 – jul/set, 2003.

LIPTAK, J.M.; DERNELL, W.S.; STRAW, R.C; JAMESON, V.J.; LAFFERTY, M.H.; RIZZO, S.A.; WITHROW, S.J. Intercalary bone grafts for joint and limb preservation in 17 dogs with high-grade malignant tumors of the diaphysis. *Veterinary Surgery*, v. 33, p. 457-467, 2004a.

LIPTAK, J.M.; DERNELL, W.S.; LASCELLES, B.D.X.; LARUE, S.M.; JAMESON, V.J.; POWERS, B.E.; HUBER, D.J.; WITHROW, S.J. Intraoperative extracorporeal irradiation for limb sparing in 13 dogs. *Veterinary Surgery*, v. 33, p. 446-456, 2004b.

LIPTAK, J.M.; PLUHAR, G.E.; DERNELL, W.S.; WITHROW, S.J. Limb-sparing surgery in a dog with osteosarcoma of the proximal femur. *Veterinary Surgery*, v. 34, p. 71-77, 2005.

LIPTAK, J.M.; DERNELL, W.S.; EHRHART, N.; LAFFERTY, M.H., MONTEITH, G.J. & WITHROW, S.J. Cortical allograft and endoprosthesis for limb-sparing surgery in dogs with distal radial osteosarcoma: a prospective clinical comparison of two different limb-sparing techniques. *Veterinary Surgery*, v.35 (6), p.518–533, 2006.

MACDONALD, T.L.; SCHILLER, T.D. Limb-sparing surgery using tatalum metal endoprosthesis in a dog with osteossarcoma of the distal radius. *Canadian Veterinary Journal*, v.51, p, 497-500, 2010.

MEUTEN, D.J. *Tumors in Domestic Animals*. Iowa: Iowa State Press (4.ed.), p.778, 2002.

MORELLO, E.; VASCONI, E.; MARTANO, M.; PEIRONE, B.; BURACCO, P. Pasteurized tumoral autograft and adjuvante chemotherapy for the treatment of canine distal radial osteossarcoma: 13 cases. *Veterinary Surgery*, v. 32, p. 539-544, 2003.

MORRIS, J.; DOBSON, J. *Oncologia em Pequenos Animais*. São Paulo: Roca. p.300, 2007.

NANCI NETO, F.; MARCHIORI, E.; VIANNA, A.D.; AYMORÉ, I.L.; ALMEIDA, A.L.B.; IRION, K.L.; COLLARES, F.B. Osteossarcoma Parosteal: Aspectos na Radiologia Convencional. *Radiologia Brasileira*. v.40, n.2, p.81-86, 2007.

NISHIDA, H.; TSUCHIYA, H.; TOMITA, K. Re-implantation of tumour tissue treated by cryotreatment with liquid nitrogen induces anti-tumour activity against murine

osteosarcoma. *Journal of Bone and Joint Surgery*, [British volume], v. 90-B, p. 1249-1255, 2008.

PAN, K. L.; CHAN, W.H.; ONG, G.B. et al. Limb salvage in osteosarcoma using autoclaved tumor-bearing bone. *World Journal of Surgical Oncology*, n. 10, v. 105, p. 1-5, 2012.

PRÓSPERO, J.D. Tumores ósseos. São Paulo: Editora Roca Ltda., p.280, 2001.

RAHMAN, M.A.; BASSIONI, A.; SHALABY, H. Reimplantation of the resected tumour-bearing segment after recycling using liquid nitrogen for osteosarcoma. *International Orthopaedics*, v.33, p. 1365-1370, 2009.

ROCHA, A.G.; WITTMACK, M.C.N.; PIETRO, N.H.P.S.; et al. Comparação de duas técnicas de desvitalização óssea extracorpórea na cirurgia de preservação de membro no tratamento de osteossarcoma em cão. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer*, Goiânia, v. 9, n. 17, p. 696 – 708, 2013.

ROSENBERGER, J.A.; PABLO, N.V. & CRAWFORD, P.C. Prevalence of and intrinsic risk factors for appendicular osteosarcoma in dogs: 179 cases (1996-2005). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 231, p.1076-1080, 2007.

SILVA, A.B.D., RODRIGUES, L., JORGETTI, W. et al. Alterações histológicas em enxerto de osso homogêneo preparado e armazenado com duas técnicas diferentes. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v.15, n.3, p.74-77, 2000.

SINGH, V.A.; NAGALINGAM, J.; SAAD, M.; PAILOOR, J. Which is the best method of sterilization of tumor bone for reimplantation? A biomechanical and histopathological study. *BioMedical Engineering OnLine*, v. 9, n. 48, p. 1-15, 2010.

STEVENSON, S. Enxertos ósseos. In: SLATTER, D. *Manual de cirurgia de pequenos animais*. 2 ed, v.2, cap. 127, p.2006-2017. São Paulo: Manole, 1998.

STRAW, R. C. Tumor of the skeletal system. In: WITHROW, S. J.; MacEWEN, E. G. *Small animal clinical oncology*. 2. ed. Philadelphia: WB Saunders, p.287-315, 1996.

TANZAWA, Y.; TSUCHIYA, H.; SHIRAI, T.; HAYASHI, K.; YO, Z.; TOMITA, K. Histological examination of frozen autograft treated by liquid nitrogen removed after implantation. *Journal of Orthopaedic Science*, v. 14, p. 761-768, 2009.

TORIGOE, T.; TOMITA, Y.; IWASE, Y.; et al. Pedicle freeing with liquid nitrogen for malignant bone tumour in the radius: a new technique of osteotomy of the ulna. *Journal of Orthopaedic Surgery*, v. 20, n. 1, p. 98-102, 2012.

TSUCHIYA, H.; WAN, S.L.; SAKAYAMA, K. et al. Reconstruction using an autograft containing tumour treated by liquid nitrogen. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, n. 87-B, p. 218-225, 2005.

TSUCHIYA, H.; NISHIDA, H.; SRISAWAT, P.; SHIRAI, T.; HAYASHI, K.; TAKEUCHI, A.; YAMAMOTO, N.; TOMITA, K. Pedicle frozen autograft reconstruction in malignant bone tumors. *Journal of Orthopaedic Science*, v. 15, n. 3, p. 340-349, 2010.

VURAL, R.; AKESEN, B.; KARAKAYALI, M.; YALÇINKAYA, U.; AYDINLI, U. The comparison of the negative effect of autoclaving and pasteurization on bone healing. *Acta Orthop Traumatol Turc.* 44(4):322-327 doi:10.3944/AOTT.2010.2382, 2010.

WALLACK, S.T.; WISNER, E.R.; WERNER, J.A.; WALSH, P.J.; KENT, M.S.; FAILEY, R.A.; HORNOF, W.J. Accuracy of magnetic resonance imaging for estimating intramedullary osteosarcoma extent in pre-operative planning of canine limb-salvage procedures. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 43 (5), p.432–441, 2002.

WITTIG, J.C.; BICKELS, J.; PRIEBAT, D.; JELINEK, J.; KELLAR-GRANEY, K.; SHMOOKLER, B.; et al. Osteosarcoma: a multidisciplinary approach to diagnosis and treatment. *American Family Physician*. v.65, p.1123-32, 2002.

WOLFE, T.D.; et al. Effect of zoledronic acid and amputation on bone invasion and lung metastasis of canine osteosarcoma in nude mice. *Clinical and Experimental Metastasis*. v.28, p.377–389, 2011.

YAMAMOTO, N.; TSUCHIYA, H. NOJIMA, T.; SUMIYA, H.; TOMITA, K. Histological and radiological analysis of autoclaved bone 2 years after extirpation. *Journal of Orthopaedic Science*, v. 8, p. 354-380, 2003.

YAMAMURO, T.; KOTOURA, Y.; KASAHARA, K.; et al. Intraoperative radiotherapy and ceramic prosthesis replacement from osteosarcoma, in Yamamuro T (ed): *New Developments for Limb-salvage in Musculoskeletal Tumors*. Tokyo, SpringerVerlag, p. 328–333, 1989.

YASIN, N.F; SINGH, V.A.; S.A.A.D., M.; OMAR, E. Which is the best method of sterilization for recycled bone autograft in limb salvage surgery: a radiological, biomechanical and histopathological study in rabbit. *BMC Cancer*. v.15,p.289. doi: 10.1186/s12885-015-1234-9, 2015.

ZERKRY, K.M. et al. Intercalary frozen autograft for reconstruction of malignant bone and soft tissue tumours. *International Orthopaedics (SICOT)*, doi: 10.1007/s00264-017-3446-x, 2017.