



Fraturas em ossos longos de *Cerdocyon thous*: avaliação macroscópica e microestrutural

Long bone fractures in *Cerdocyon thous*: macroscopic and microstructural evaluation

Felipe Martins Pastor¹ , Gabriela de Oliveira Resende¹ , Júlio Francisco Valiati Marin¹ , Louisiane de Carvalho Nunes¹ , Guilherme Galhardo Franco¹ , Jankerle Neves Boeloni¹ , Maria Aparecida da Silva^{1*}

¹Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Alegre, ES, Brasil

*Correspondente: mvmariaaparecida@gmail.com

Resumo

Teve-se como objetivo, no presente trabalho, realizar a classificação morfológica macroscópica e microestrutural das fraturas em ossos longos de *Cerdocyon thous*. Foram utilizados 18 cadáveres da espécie, necropsiados e submetidos à avaliação radiográfica e microscópica quando detectadas fraturas em ossos longos. Dentre os 18 animais, oito (44%) possuíam fraturas igualmente distribuídas (33,33%) em fêmur, úmero ou tíbia. Mais frequentemente (61,54%) as fraturas eram simples e acometiam a diáfise, e em menores proporções (23,08%) atingiam a linha fisária. Nas fraturas em diáfise e metáfise, predominava o tecido ósseo cortical, com osteons longitudinais que continham fibras colágenas longitudinais e intermediárias, e lamelas com aspecto de delaminação. Por outro lado, nas fraturas fisárias, o tecido ósseo trabecular foi mais frequentemente observado, constituído por trabéculas com fibras colágenas desorganizadas e ausência de osteons. Em ambos os casos, notou-se baixa atividade de osteócitos e baixa cobertura de osteoblastos na superfície óssea. Conclui-se que, nas condições observadas, a frequência de fraturas em ossos longos de *C. thous* foi de 44%, sendo as fêmeas mais predispostas, além de os achados embasarem a hipótese da ocorrência de tais lesões estarem relacionadas a atropelamentos. O presente estudo contribui significativamente para alertar clínicos e cirurgiões em relação aos tipos de fraturas as quais *C. thous* está mais predisposto, seus locais de maior ocorrência e sua microestrutura. Dessa forma, surge a necessidade de implementação de ações conjuntas que visem reduzir o número de casos de atropelamento de animais silvestres.

Palavras-chave: Atropelamentos. Biologia óssea. Ortopedia. Traumatologia.

Abstract

The aim of the present study was to perform the macroscopic and microstructural morphological classification of long

Recebido
15 de fevereiro de 2021.
Aceito
23 de abril de 2021.
Publicado
5 de julho de 2021.

www.revistas.ufg.br/vet
Como citar - disponível no
site, na página do artigo.

bone fractures of *Cerdocyon thous*. Eighteen cadavers of the species were necropsied, and subjected to radiographic and microscopical evaluation when long bone fractures were detected. Among the 18 cadavers, eight (44%) had fractures equally distributed (33.33%) in the femur, humerus, or tibia. More frequently (61.54%), the fractures were simple and affected the diaphysis, and in smaller proportions (23.08%) reached the physeal line. In diaphyseal and metaphyseal fractures, microscopical evaluation revealed cortical bone tissue, with longitudinal osteons that contained longitudinal and intermediate collagen fibres and lamellae with a delamination aspect. On the other hand, in epiphyseal fractures, trabecular bone tissue was more frequently observed, consisting of trabeculae with disorganised collagen fibres and absence of osteons. In both cases low activity, osteocytes, and low coverage of osteoblasts on the bone surface were noted. It was concluded that the frequency of fractures in the long bones of *C. thous* was 44%, with females being more predisposed. The findings support the hypothesis that fractures in such animals are caused by being run over by automobiles. The present study contributes significantly in alerting clinicians and surgeons to the types of fractures that *C. thous* is more predisposed to, its places of greatest occurrence, and its microstructure. Thus, there is a need for joint actions aimed at reducing the number of cases of wild animals being run over by automobiles.

Keywords: Bone biology. Orthopaedics. Run-over accidents. Trauma.

Introdução

O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) é uma das seis espécies de canídeos nativos da América do Sul, sendo caracterizada como de porte médio, com hábitos oportunistas e alimentação generalista, que varia desde frutas, ovos e pequenos invertebrados, até pequenos mamíferos⁽¹⁾. Suas áreas de ocorrência incluem florestas tropicais e subtropicais, descampados, e ambientes antrópicos. A maior parte das populações habita as regiões entre Colômbia e Venezuela, Paraguai, Argentina e Brasil⁽²⁾.

Mesmo com a ampla gama de ambientes nos quais a espécie pode ser encontrada, a mesma sofre com constantes ameaças à sua preservação. Considerando o impacto relacionado ao traumatismo, os atropelamentos representam uma das principais causas de mortalidade para *C. thous*. A taxa de óbitos notificados para tal espécie, causados por atropelamentos, pode chegar a 79,5% do total de animais mortos⁽³⁾. No Estado do Espírito Santo, Martinelli e Volpi⁽⁴⁾ relataram a mortalidade de 14,54% de *C. thous*, em relação às demais espécies, vítimas de traumas decorrentes dos acidentes automobilísticos, enquanto Ferreira et al.⁽⁵⁾ descreveram que 25,58% dos atropelamentos envolvem a espécie.

Apesar de ser uma das seis espécies de canídeos nativos da América do Sul, estudos relacionados à frequência de fraturas em ossos longos em *C. thous* ainda não foram realizados. Da mesma forma, pesquisas conduzidas com objetivo de avaliar a morfologia da superfície das fraturas ósseas, bem como elucidar o mecanismo de ruptura

tecidual também não foram realizadas. O estudo das características macroscópicas e microestruturais das fraturas ósseas permite desvendar o processo fisiopatológico da ruptura tecidual, de forma a auxiliar a escolha da melhor terapia a ser instituída em cada caso, especialmente os cirúrgicos⁽⁶⁾. O conhecimento em relação aos tipos de fraturas e seus sítios de maior ocorrência pode auxiliar médicos veterinários, clínicos e cirurgiões, a agirem de forma mais rápida e eficaz no tratamento de canídeos vítimas de atropelamentos. Com a melhoria nas condutas terapêuticas, a reinserção de animais selvagens, como *C. thous*, em seu habitat se torna mais rápida e eficaz.

Assumindo a hipótese de que fraturas ósseas em canídeos silvestres podem ter sua ocorrência relacionada a atropelamentos por veículos automotivos, objetivou-se com o presente estudo realizar a avaliação morfológica macroscópica e microestrutural de fraturas em ossos longos de *Cerdocyon thous*, a fim de determinar sua frequência de ocorrência, e elucidar os mecanismos de ruptura tecidual e suas relações com atropelamentos por veículos automotivos. Espera-se que este estudo possa contribuir para a melhoria de condutas terapêuticas, em especial dos tratamentos cirúrgicos, levando a uma melhora no prognóstico dos animais acometidos, contribuindo assim para a preservação da espécie.

Material e métodos

A presente pesquisa possui aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Espírito Santo, sob o protocolo nº 65/2017.

Para a realização da pesquisa, foram utilizados 18 cadáveres de *Cerdocyon thous*, obtidos por meio de doações realizadas pela Reserva Biológica de Sooretama - ES (n=11), Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) (n=2), e pelo Hospital Veterinário da Universidade Federal do Espírito Santo (n=5).

A amostra era composta por 12 machos (cinco jovens e sete adultos) e seis fêmeas (três jovens e três adultas), todos com até 12 horas de ocorrência do óbito. O exame necroscópico foi realizado no Laboratório de Patologia Animal da Universidade Federal do Espírito Santo. Foram desarticulados os membros torácicos e pélvicos, e realizada a avaliação radiográfica naqueles em que foram observadas evidências macroscópicas de fraturas em ossos longos. Após, todos os ossos fraturados (n=12) foram dissecados, removendo-se a musculatura, tendões, ligamentos e demais tecidos moles.

Após a dissecação, efetuou-se a classificação macroscópica das fraturas de acordo com os padrões propostos por Salter e Harris⁽⁷⁾, Müller et al.⁽⁸⁾, e Unger et al.⁽⁹⁾, agrupando as lesões de acordo com a localização anatômica, o número de fragmentos, gravidade e direção da linha de fratura.

Após a classificação das fraturas, realizou-se a coleta de fragmentos ósseos para avaliação microscópica em todos os ossos fraturados (n=12). Para tal, utilizou-se serra fita, obtendo-se três secções de até 1 cm de espessura em cada osso, imediatamente abaixo da linha de fratura, como esquematizado na Figura 1. A fim de comparar as características morfológicas, fragmentos controle dos ossos contralaterais (úmero,

fêmur e tíbia) dos mesmos indivíduos foram coletados, sendo escolhidas as regiões correspondentes aos locais da ocorrência das fraturas.

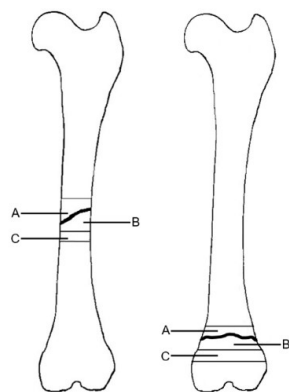


Figura 1. Esquema dos cortes ósseos transversais obtidos para análise microestrutural das fraturas em ossos longos de *Cerdocyon thous*. A) Fragmentos para microscopia eletrônica de varredura. B) Fragmentos para microscopia óptica. C) Fragmentos para microscopia de luz polarizada.

Os fragmentos proximais da linha de fratura (Figura 1, A) foram lavados em solução tampão de fosfato de sódio (PBS – pH 7,2), e fixados em solução de glutaraldeído 2,5% para avaliação por microscopia eletrônica de varredura. O processamento consistiu na lavagem em água destilada e desidratação em concentrações crescentes de etanol (30%-100%), seguida de secagem em estufa a 37 °C por 24 h. Como a desidratação foi eficaz, a etapa de secagem em ponto crítico não foi necessária.

As avaliações por meio de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR), do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo. Previamente, as amostras foram metalizadas por evaporação em ouro (Denton Vacuum Desk V) e então analisadas ao microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-6610). As amostras foram avaliadas nas ampliações de 50×, 200×, e 1200×, sendo observada a morfologia da superfície de fratura e o padrão de ruptura tecidual, com intuito de desvendar o mecanismo de ocorrência da fratura em cada um dos casos.

Os fragmentos distais da linha de fratura (Figura 1, B e C) foram submetidos à fixação em solução de formalina 10% por no mínimo 48 horas, para posteriores avaliações por microscopia óptica convencional e microscopia de luz polarizada.

A fim de avaliar a morfologia tecidual e atividade celular, utilizou-se a microscopia óptica convencional. Para a confecção das lâminas histológicas, os fragmentos ósseos foram descalcificados com base no protocolo utilizado por Morse⁽¹⁰⁾, em solução de ácido fórmico e citrato de sódio. Finalizado o processo, as amostras foram então submetidas ao processamento histológico padrão para inclusão em parafina, cortadas a 3 µm de espessura e coradas com Hematoxilina e Eosina (H&E). As avaliações foram realizadas em microscópio óptico Leica ICC50 HD, no qual os fragmentos foram avaliados nos aumentos de 10× e 40×.

Na microscopia de luz polarizada, foi investigada a orientação das fibras colágenas do

tipo I pela sua capacidade de birrefringência. Para tal, optou-se pela confecção de lâminas histológicas pela técnica de desgaste, na qual os fragmentos ósseos foram fixados em lâminas de vidro e desgastados manualmente com lixas d'água, até a espessura aproximada de 100 µm. Os fragmentos foram então lavados em água corrente, secos e cobertos por bálsamo do Canadá e lamínula de vidro.

As amostras foram avaliadas em microscópio óptico Nikon E200 equipado com polarizador, no Laboratório de Microscopia do Departamento de Geologia, Universidade Federal do Espírito Santo. As lâminas foram observadas nos aumentos de 10× e 40× sendo classificadas de acordo com a padronização proposta por Ascenzi e Bonucci⁽¹¹⁾. Os autores classificam os ósteons em três tipos, sendo: tipo um ou claro, de fibras transversais; tipo dois ou intermediário, composto por fibras transversais e longitudinais simultaneamente; e tipo três, também denominado escuro, formado por fibras colágenas dispostas de forma longitudinal.

A análise estatística descritiva foi realizada a fim de se estabelecer percentual de animais que apresentavam fraturas, bem como a frequência de ossos fraturados e a distribuição das fraturas ao longo do eixo ósseo. Para tal, utilizou-se do software BioEstat 5.0⁽¹²⁾.

Resultados e discussão

Classificação das fraturas por meio das avaliações radiográfica e macroscópica

A partir dos dados obtidos, observou-se que oito dos 18 exemplares de *Cerdocyon thous* avaliados neste estudo apresentavam fraturas em ossos longos, representando 44% do total de indivíduos. Dentre estes, quatro eram fêmeas (duas jovens e duas adultas) e quatro eram machos (dois jovens e dois adultos). Proporcionalmente, as fêmeas foram duas vezes mais acometidas que os machos (66,67% e 33,33%, respectivamente). Dados relacionados à frequência de fraturas em cães domésticos indicam que machos são mais acometidos que fêmeas^(13, 14), informação que contrasta com os resultados do presente estudo.

Em 38% dos indivíduos afetados (3/8), mais de um osso longo apresentava-se fraturado, totalizando 12 ossos com fraturas. Enquanto isso, um dos ossos apresentou duas fraturas distintas. Do total de 12 ossos fraturados, os mais frequentes foram três úmeros esquerdos (25%) e três tíbias direitas (25%). No entanto, úmero, fêmur e tíbia apresentaram a mesma frequência, sendo cada um deles responsável por 33,33% dos casos de fratura.

Dentre os 18 indivíduos utilizados na presente pesquisa, 11 eram oriundos da Reserva Biológica de Sooretama - ES, e destes, cinco (45,45%) apresentaram ossos longos fraturados. Acredita-se que devido à presença de fraturas e achados necroscópicos como lacerações musculares e extensas hemorragias, tais animais foram vítimas de atropelamento por veículos automotivos, tendo em vista que a reserva é atravessada por uma rodovia, aumentando o risco de atropelamento. A relevância dos atropelamentos de *C. thous* nas rodovias do Espírito Santo foi comprovada pelos estudos realizados por Martinelli e Volpi⁽⁴⁾, em que *C. thous* foi a terceira espécie mais acometida por atropelamentos, representando 14,54% (8/55) do total de animais mortos. As mesmas inferências foram feitas por Ferreira et al.⁽⁵⁾, que encontraram 258 mamíferos mortos

por atropelamento em uma rodovia, dos quais 66 foram identificados como *C. thous*, representando 25,58% do total.

No intuito de reduzir as taxas de atropelamentos de animais silvestres em áreas de reservas biológicas, são necessárias ações conjuntas, como a instalação de redutores de velocidade, criação de corredores ecológicos e a conscientização da sociedade civil quanto à preservação da fauna nativa. Para os animais acometidos, é essencial o atendimento veterinário de emergência, sendo requeridas medidas terapêuticas clínicas e cirúrgicas específicas em cada caso.

A frequência de animais que apresentaram fraturas ósseas, bem como a frequência dos ossos fraturados encontrados neste estudo, diferem daquelas encontradas por Libardoni et al.⁽¹⁵⁾. Os autores, ao caracterizarem as fraturas apendiculares em cães domésticos, observaram que, de 781 casos de cães com fraturas de origem conhecida, 72,2% apresentaram fraturas secundárias a atropelamentos por veículos automotivos, frequência consideravelmente superior à encontrada aqui. Dentro desse grupo, os autores afirmam que as fraturas em pelve foram mais prevalentes (25,2%), seguidas por fraturas de fêmur (19,5%), tíbia e fíbula (15,2%), rádio e ulna (6,4%), úmero (3,2%) e ossos distais ao tarso e carpo (2,7%). Tal discrepância pode ser atribuída a maior amostragem utilizada pelos autores, além do fato de que utilizaram em sua pesquisa apenas cães com suspeita de afeções ortopédicas.

Vidane et al.⁽¹⁶⁾ apontaram que 91,59% das fraturas em cães domésticos se localizavam em ossos do esqueleto apendicular, cuja principal causa foi o atropelamento por veículos automotivos. Os autores relatam 35,74% de acometimento do fêmur, seguido por tíbia e fíbula (21,92%), rádio e ulna (12,01%) e úmero (6,91%). Os resultados das pesquisas com cães domésticos apontam as fraturas em fêmur como as mais prevalentes, enquanto as aqui observadas indicam a mesma frequência em úmero, fêmur e tíbia.

De acordo com Figuera et al.⁽¹⁷⁾, dos 155 cães domésticos considerados em pesquisa relacionada aos aspectos patológicos do trauma originado por atropelamentos, 32% foram acometidos por fraturas ósseas. Os autores relatam a frequência de 12,9% de fraturas em pelve, 12,2% em ossos longos e 7,1% em costelas. Dentre os ossos longos acometidos, relatam-se: fêmur (78,9%), tíbia (26,3%), úmero (26,3%), rádio (21%), fíbula (15,8%) e ulna (10,5%). Tais relatos vão ao encontro dos dados aqui obtidos, evidenciando que fêmur, úmero e tíbia são os ossos longos mais frequentemente acometidos por fraturas decorrentes de atropelamentos em canídeos. No entanto, os autores relatam que o fêmur apresentou maior prevalência de fraturas quando comparado aos demais, diferindo dos resultados deste estudo. Tal discrepância pode ser associada a diferenças no tamanho amostral utilizado pelos autores (n=155) em comparação ao do presente estudo (n=18).

Alguns autores relatam maior frequência de acometimento do fêmur, seguido pela tíbia e fíbula, quando se consideram apenas os membros pélvicos^(14, 18, 19). Nos membros torácicos, existe maior acometimento de rádio e ulna, tendo em vista a menor cobertura muscular regional, conferindo menor proteção mecânica frente aos impactos causados pelos atropelamentos⁽²⁰⁾. No presente estudo, o úmero foi o único osso que apresentou fratura no membro torácico. Tal fato indica que, apesar da maior cobertura muscular encontrada no úmero em comparação ao rádio e ulna, esta não é suficiente na proteção

contra impactos como aqueles relacionados aos atropelamentos. Contudo, a ausência de fraturas em rádio e ulna pode ser atribuída ao acaso, sendo necessários estudos com maior número amostral para verificação desta hipótese.

Segundo Keosengthong et al.⁽¹⁴⁾, Libardoni et al.⁽¹⁵⁾ e Minar et al.⁽²¹⁾, fraturas relacionadas aos atropelamentos por veículos automotivos são mais frequentes nos membros pélvicos que torácicos. Tal fato é corroborado pela presente pesquisa, na qual se concluiu que 66,67% das fraturas acometiam ossos dos membros pélvicos. No entanto, Siqueira et al.⁽²²⁾ descrevem ocorrência proporcional de fraturas em membros pélvicos (49%) e torácicos (51%) em cães domésticos, cuja principal etiologia foi o atropelamento por veículos automotivos.

A avaliação radiográfica das fraturas (Figura 2) e a análise macroscópica (Tabela I) demonstraram concordância, permitindo o estabelecimento da classificação macroscópica confiável para as fraturas em ossos longos de *C. thous* neste estudo. Em ambas as avaliações, as fraturas puderam ser classificadas de acordo com os padrões propostos por Salter e Harris⁽⁷⁾, Müller et al.⁽⁸⁾ e Unger et al.⁽⁹⁾.



Figura 2. Radiografias e fotomicrografias das principais fraturas em fêmur, úmero e tíbia de *Cerdocyon thous*. A) Fratura transversa em diáfise (seta) de fêmur direito de um macho adulto. B) Fratura Salter-Harris tipo II em linha fisária distal (seta) de fêmur esquerdo de um macho jovem. C) Fratura oblíqua em metáfise distal (seta) de úmero direito de um macho jovem. D) Fratura intercondilar complexa segmentada em região distal (seta) de úmero direito de uma fêmea adulta. E) Fratura oblíqua em diáfise (seta) de tíbia direita de um macho jovem. F) Fratura Salter-Harris tipo I em linha fisária distal (seta) de tíbia direita de uma fêmea jovem.

Tabela I - Classificação morfológica das fraturas em ossos longos de *Cerdocyon thous*

OSSO	TIPO		SUBTIPO		LOCALIZAÇÃO	
FÊMUR	Simples	75%	Simples transversa	100%	Diáfise	100%
	SH-II	25%			Epífise distal	100%
ÚMERO	Simples	60%	Simples oblíqua	75%	Metáfise distal	50%
			Diáfise	50%		
			Simples transversa	25%	Diáfise	100%
	Cunha	20%	Cunha em curva	100%	Diáfise	100%
	Complexa	20%	Complexa segmentada	100%	Terço distal	100%
TÍBIA	Simples	75%	Simples oblíqua	67%	Diáfise	100%
			Simples transversa	33%	Diáfise	100%
	SH-I	25%			Epífise distal	100%
TOTAL	TIPO		SUBTIPO		LOCALIZAÇÃO	
	Simples	61,54%	Simples oblíqua	23,08%	Diáfise	61,54%
			Simples transversa	38,46%	Epífise distal	23,08%
	Cunha	7,69%	Cunha em curva	7,69%	Metáfise distal	7,69%
	Complexa	7,69%	Complexa segmentada	7,69%	Terço distal	7,69%
	SH-I	7,69%	SH-I	7,69%		
	SH-II	7,69%	SH-II	7,69%		

SH-I: Salter-Harris tipo I. SH-II: Salter-Harris tipo II.

Com base nas informações expostas, nota-se que a maioria das fraturas observadas era classificada como simples (61,54%). Dentre elas, as transversas foram mais comumente diagnosticadas em relação às oblíquas. Em menores proporções, também se notou uma fratura cunha em curva e uma fratura intercondilar complexa. Em cães domésticos, Keosengthong et al.⁽¹⁴⁾ reportaram maior incidência de fraturas transversas (68%), seguidas pelas cominutivas (12,2%) e oblíquas (9,4%), com atropelamento sendo a principal causa descrita pelos autores.

As fraturas transversas e oblíquas podem ser originadas pelas cargas de compressão ou flexão. As fraturas oblíquas, além da compressão, podem ser geradas a partir de torção, enquanto as complexas são associadas à aplicação de cargas com alta velocidade, ou várias direções de aplicação de força^(23, 24, 25). Baseado em tal informação, pode-se considerar que as fraturas observadas no presente estudo, principalmente as complexas, foram causadas por atropelamentos.

Em se tratando da localização de ocorrência das fraturas ao longo do eixo ósseo,

61,54% das fraturas foram observadas na diáfise. Em menores proporções, 15,54% foram observadas na metáfise óssea ou em todo o terço distal ósseo. Das treze fraturas, apenas duas foram englobadas na classificação de Salter-Harris⁽⁷⁾, sendo dos tipos I e II. Em ambos os casos, as fraturas ocorreram em animais jovens, que ainda apresentavam remanescentes de cartilagem fisária. Acredita-se que a linha fisária tenha sido o local da fratura, por não ter ocorrido a finalização do processo de ossificação, e, portanto, tal local se tornou mais frágil e com menor habilidade de dissipar as cargas relacionadas ao impacto direto com veículos automotivos.

Avaliação microscópica

A partir da avaliação da morfologia tecidual e atividade celular por meio de microscopia óptica convencional, observou-se tecido ósseo preservado e bem organizado, tanto nos fragmentos controle quanto nos fragmentos de fraturas.

Notou-se, para fraturas diafisárias (Figura 3, A-B), tecido ósseo secundário disposto sob a forma de ósteons e lamelas circunferenciais. Os osteócitos apresentavam formato fusiforme a estrelado, com limites citoplasmáticos parcialmente definidos. Os citoplasmas se mostravam escassos, eosinofílicos e homogêneos, com núcleos ovais a alongados, de localização paracentral, cromatina densa e nucléolos indistintos. Além disso, foi observada, nos fragmentos de ossos fraturados, quantidade variável de formação de microtrincas que comprometiam a arquitetura tecidual.

Nas amostras de fraturas fisárias (Figura 3, C-D), notou-se tecido ósseo primário, composto por trabéculas ósseas espessas e confluentes, com baixa cobertura endosteal. Os osteoblastos possuíam formato alongado, com citoplasma eosinofílico e núcleos com cromatina condensada. Também foram notados processos de ossificação nas trabéculas ósseas, em que os osteoblastos apresentavam citoplasma amplo e eosinofílico, cercado por matriz osteoide recém-sintetizada. Por sua vez, os osteócitos presentes possuíam formato estrelado a alongado. Os citoplasmas eram escassos, eosinofílicos e homogêneos, enquanto os núcleos possuíam formato oval a alongado, com localização paracentral, cromatina densa e nucléolos indistintos.

Naturalmente, pela reduzida taxa metabólica, os osteócitos exibem citoplasma achatado e núcleo com cromatina condensada, indicando baixa atividade celular, segundo Junqueira e Carneiro⁽²⁶⁾, o que condiz com os achados observados no presente estudo. Em relação aos osteoblastos, os mesmos autores afirmam que a célula assume aspecto achatado e seu citoplasma se torna pouco basofílico, quando as mesmas não estão em atividade osteogênica, como observado nas amostras do presente estudo.

De acordo com Jika et al.⁽²⁷⁾, a apoptose é caracterizada por redução do volume celular, colapso do citoesqueleto e fragmentação nuclear. Para uma adequada avaliação do fenômeno, os autores indicam técnicas como a marcação de DNA fragmentado, contagem de células afetadas, ou a simulação da probabilidade de ocorrência do evento, sendo esta última indicada para humanos. Dadas as limitações do presente estudo, tais técnicas não puderam ser utilizadas. No entanto, na ausência de indicativos histológicos de colapso do citoesqueleto e fragmentação nuclear, assume-se que as células ósseas se apresentavam íntegras. Da mesma forma, pela ausência de alterações histológicas

compatíveis com processo inflamatório, é possível concluir que a morte dos animais do presente estudo se deu em um curto período de tempo após a ocorrência das fraturas.

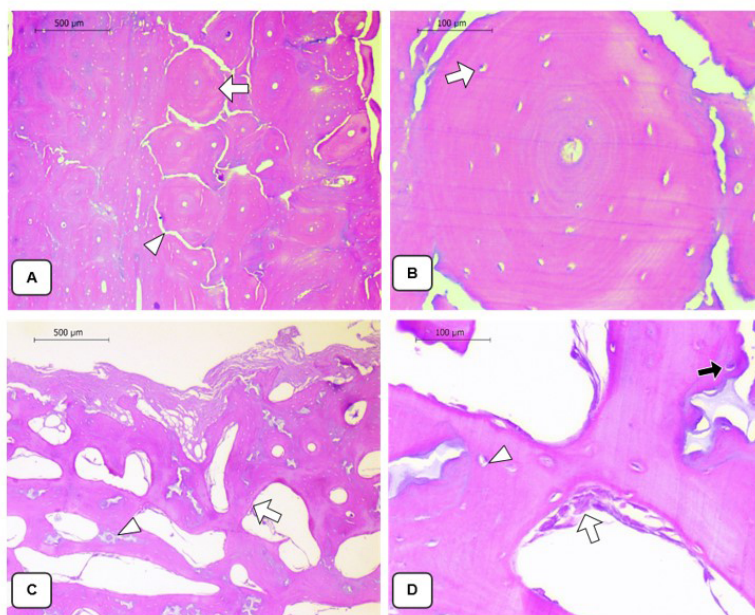


Figura 3. Microscopia óptica convencional em fragmentos de fraturas em fêmures esquerdos de *Cerdocyon thous*. A) Fragmento de fratura diafisária exibindo tecido ósseo secundário, composto por osteons (seta), com presença de microtrincas (cabeça de seta). H&E, barra: 500 µm. B) Aumento de A, evidenciando osteócitos com citoplasma escasso e núcleo pequeno (seta). H&E, barra: 100 µm. C) Fragmento de fratura fisária apresentando tecido ósseo primário, com trabéculas espessas e confluentes (seta) e focos de ossificação intramembranosa (cabeça de seta). H&E, barra: 500 µm. D) Aumento de C, mostrando osteoblastos alongados, com citoplasma fracamente basofílico e núcleos com cromatina condensada (seta branca), focos de ossificação com osteoblastos de citoplasma amplo e eosinofílico, cercado por osteoide recém-sintetizado (seta preta) e osteócitos (cabeça de seta). H&E, barra: 100 µm.

A avaliação da orientação espacial das fibras colágenas do tipo I, por meio da microscopia de luz polarizada, evidenciou dois padrões microscópicos distintos. Nas fraturas diafisárias (Figura 4, A-B) observou-se predominância de osteons do tipo três (escuro) e dois (intermediário), com fibras organizadas de forma longitudinal e intermediária, respectivamente. Enquanto isso, nas fraturas fisárias (Figura 4, C-D), não se notou a organização típica das fibras colágenas sob a forma de osteons, mas de forma dispersa, e, predominantemente, transversal.

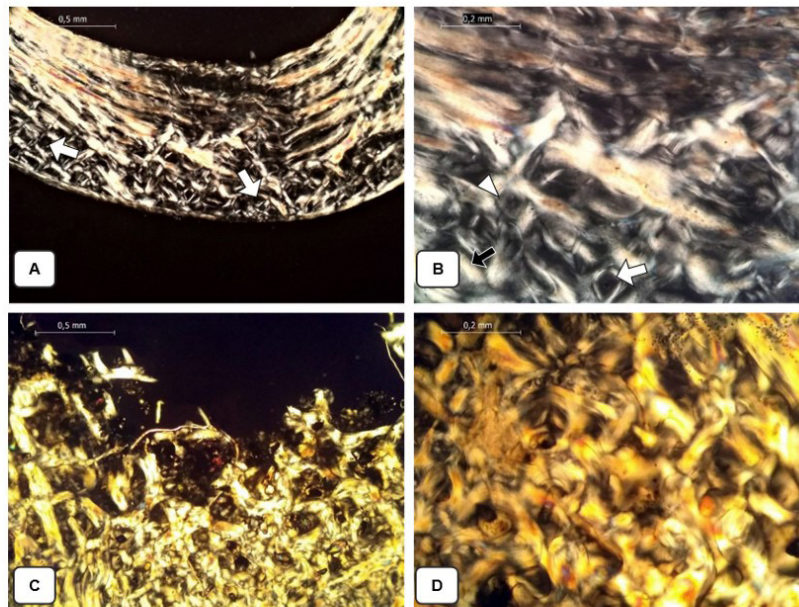


Figura 4. Microscopia de luz polarizada em fragmentos de fraturas de úmero e fêmur de *Cerdocyon thous*. A) Fotomicrografia de fragmento de fratura em úmero esquerdo, evidenciando grupamentos multifocais de ósteons com fibras colágenas longitudinais (setas). Barra: 0,5 mm. B) Ampliação de A, com ósteons do tipo escuro (seta branca), intermediário (cabeça de seta) e claro (seta preta). Barra: 0,2 mm. C) Fragmento de fratura em fêmur esquerdo, exibindo fibras colágenas dispostas em trabéculas refringentes, com organização predominantemente transversal, com ausência de ósteons. Barra: 0,5 mm. D) Ampliação da área observada em A. Barra: 0,2 mm.

A organização das fibras colágenas no interior dos ósteons é um dos fatores de maior influência na biomecânica óssea. O tecido ósseo é mais resistente quando a carga é aplicada em sentido fisiológico, ou seja, no sentido da orientação dos ósteons no osso cortical^(28, 29). No presente estudo, observou-se ósteons orientados longitudinalmente, com a predominância de fibras longitudinais e intermediárias. Os ósteons deste último tipo possuem fibras tanto em sentido longitudinal quanto transversal. A presença de ósteons com fibras longitudinais é comumente relatada em regiões do osso que suportam cargas de tração com maior frequência⁽³⁰⁾.

Aspectos morfológicos similares são encontradas em outras espécies de mamíferos. No osso cortical de metacarpos de equinos, Martin *et al.*⁽³⁰⁾ confirmam que fibras colágenas dispostas em sentido longitudinal possuem maior resistência quando comparadas às transversais. Ramasamy e Akkus⁽³¹⁾ relatam achados análogos em osso cortical de ratos, indicando ainda que a região cranial do osso apresenta maior quantidade de fibras colágenas em sentido longitudinal, em comparação às regiões caudais.

A maioria das fraturas dos ossos do presente estudo foi classificada como dos

tipos transversas e oblíquas, associadas a maior presença de fibras longitudinais e intermediárias. Isso pode indicar que a maioria das fraturas foi causada por cargas de flexão, uma vez que ósteons com fibras longitudinais são menos resistentes quando o sentido da carga é perpendicular às fibras colágenas⁽²⁸⁾. Tal fato suporta a hipótese de que as fraturas tenham ocorrido devido ao trauma por atropelamentos.

A avaliação morfológica da superfície de fratura e mecanismo de ruptura tecidual por meio da microscopia eletrônica de varredura revelou dois padrões teciduais distintos para as amostras. Nas fraturas de diáfise e metáfise (Figura 5, A-B), observou-se predominantemente tecido ósseo cortical, de aspecto denso, bem organizado e ocupado por ósteons do tipo três. Tais estruturas, em sua maioria, estavam dispostas em sentido longitudinal, com lamelas evidentes e fibras colágenas dispostas em sentido longitudinal. Morfologicamente, a superfície de fratura possuía aspecto áspero, com ósteons e lamelas em delaminação, e abundante presença de microtrincas. Em algumas regiões, foi possível notar também ósteons com lamelas pouco distintas e aparência de deflexão.

Nas amostras originadas de fraturas fisárias (Figura 5, C-D), notou-se tecido ósseo trabecular e regiões remanescentes da cartilagem fisária. O tecido ósseo apresentava-se desorganizado, composto por trabéculas com fibras colágenas dispostas sem padronização evidente.

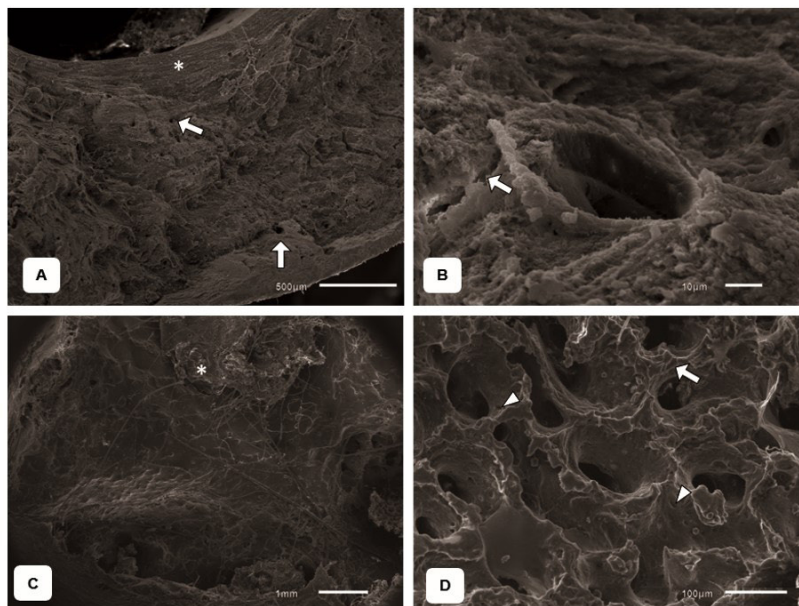


Figura 5. Microscopia eletrônica de varredura da superfície de fratura de úmero e tíbia de *Cerdocyon thous*. A) Osso cortical de fratura transversa em úmero, com lamelas circunferenciais (asterisco) e ósteons (setas). Barra: 500µm. B) Ampliação de A, evidenciando microtrinca (seta) ao redor de um ósteon. Barra: 10µm. C) Área de cartilagem fisária em fratura de tíbia direita. Barra: 1mm. D) Aumento de C, onde notam-se trabéculas ósseas (seta) e lacunas (cabeça de seta). Barra: 100µm.

Segundo a literatura, a superfície áspera se torna evidente nas fraturas com maior absorção e distribuição de energia, sendo originada em razão da transição dúctil-frágil do tecido ósseo⁽³²⁾, como observado em casos de trauma de alto impacto. Nas superfícies ásperas, predomina o mecanismo de fratura por delaminação, que consiste na ruptura das lamelas em níveis diferentes, o que dá às lamelas a aparência de lascas. Por sua vez, na superfície de fratura com aspecto mais liso, a ruptura do tecido se dá por deflexão, em que há quebra do ósteon em sentido transversal e em local específico⁽³³⁾.

A presença de microtrincas na superfície de fratura indica distribuição das tensões ao longo do osso, como mecanismo de redução e redistribuição da energia. As trincas se iniciam em locais de maior fragilidade óssea, como as linhas de cimentação e têm sua propagação impedida em locais como as lamelas osteonais^(34, 35, 36).

Em síntese, o presente estudo traz luz no que diz respeito à incidência e morfologia de fraturas em ossos longos de *Cerdocyon thous*. Logo, as informações aqui dispostas podem auxiliar médicos veterinários, clínicos e cirurgiões, a agirem de forma mais eficaz face ao problema exposto. Dessa forma, espera-se que a melhoria nas condutas clínicas e terapêuticas, combinadas com ações conjuntas que visem a redução da taxa de atropelamentos de fauna silvestre e auxiliem na preservação da biodiversidade brasileira.

Conclusões

Há alta frequência de fraturas em ossos longos de *Cerdocyon thous*, sendo que fêmeas possuem duas vezes mais predisposição em relação aos machos. Os achados macro e microscópicos são consistentes com a hipótese de que as fraturas em tais animais foram causadas por traumas relacionados ao atropelamento por veículos automotivos. São necessárias medidas conjuntas que visem a redução dos casos de atropelamentos de animais silvestres, contribuindo assim para a preservação da biodiversidade brasileira.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) - Edital FAPES/CNPq 04/2017 - PPP - Programa Primeiros Projetos, Termo de outorga: 116/2017 SIAFEM: 8060422, pelo suporte financeiro e pela concessão de bolsa de estudos para o primeiro autor. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) da Universidade Federal do Espírito Santo e ao edital MCT/FINEP/CT-INFRA PROINFRA 01/2006 pelas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Referências

1. Emmons L, Feer F. Neotropical rainforest mammals: a field guide. 2nd. ed. University of Chicago Press; 1997. Available from: <https://doi.org/10.1017/S0376892998250223>
2. Courtenay O, Maffei L. *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766). In: Hoffmann M, Sillero-Zubiri C. Canid Action Plan. IUCN Publications, Gland, Switzerland; 2004; 32-37.
3. de Araujo Cezar HR, Abrantes SHF, de Lima JPR, De Medeiros JB, Abrantes MMR, da Nóbrega Carreiro A, de Lucena Barbosa JP. 2021. Mamíferos silvestres atropelados em estradas da Paraíba, Nordeste do Brasil. Brazilian Journal of Development 2021; 7(3):30694-30698. Available from <https://doi.org/10.34117/bjdv7n3-679>
4. Martinelli MM, Volpi TA. Mamíferos atropelados na Rodovia Armando Martinelli (ES-080), Espírito Santo, Brasil. Natureza on line 2011; 9(3):113-116. Available from: http://www.naturezaonline.com.br/natureza/conteudo/pdf/04_martinellimm&volpita_113_116.pdf
5. Ferreira CM, de Aquino Ribas AC, Casella J, Lucena-Mendes S. Variação espacial de atropelamentos de mamíferos em área de restinga no estado do Espírito Santo, Brasil. Neotropical Biology Conservation 2014; 9(3):125-133. Available from: <https://doi.org/10.4013/nbc.2014.93.02>
6. DeCamp, Charles E. Brinker, Piermattei and Flo's handbook of small animal orthopedics and fracture repair. 5th ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Health Sciences; 2016. Available from: <https://doi.org/10.1016/C2009-0-64185-4>
7. Salter RB, Harris WR. Injuries involving the epiphyseal plate. Journal of Bone and Joint Surgery 1963; 45(3):587-622. Available from: https://journals.lww.com/jbjsjournal/Citation/2001/11000/Injuries_Involving_the_Epiphyseal_Plate.21.aspx
8. Müller ME, Koch P, Nazarian S, Schatzker J. Principles of the classification of fractures. In: Müller ME, Nazarian S, Koch P, Schatzker J. The comprehensive classification of fractures of long bones. Berlin: Springer; 1990: 4-7. Available from: https://doi.org/10.1007/978-3-642-61261-9_2
9. Unger M, Montavon PM, Heim UFA. Classification of fractures of long bones in the dog and cat: introduction and clinical application. Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology 1990; 3:41-50. Available from: <https://doi.org/10.1055/s-0038-1633228>
10. Morse, A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. Journal of Dental Research 1945; 24(3-4):143-153. Available from: <https://doi.org/10.1177%2F00220345450240030501>
11. Ascenzi A, Bonucci E. The compressive properties of single osteons. Anatomical Record 1968; 161(3):377-391. Available from: <https://doi.org/10.1002/ar.1091610309>
12. Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos ADA. 2007. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas. Instituto Mamirauá, Belém, 364
13. Abd El Raouf M, Ezzeldein SA, Eisa EFM. Bone fractures in dogs: a retrospective study of 129 dogs. Iraqi Journal of Veterinary Sciences 2019; 33(2):401-405. Available from: https://vetmedmosul.com/article_163086_2b07006a0a66c142fbdd156045c601ff.pdf
14. Keosengthong A, Kampa N, Jitpean S, Seesupa S, Kunkitti P, Hoisang S. Incidence and classification of bone fracture in dogs and cats: a retrospective study at veterinary teaching hospital, Khon Kaen University, Thailand (2013-2016). Veterinary Integrative Sciences 2019; 17(2):127-139. Available from: <http://www.vet.cmu.ac.th/cmvi/document/vol.17/number2/2019%2017-2%20%5B21%5D.pdf>

15. Libardoni RDN, Serafini GMC, Oliveira CD, Schimites PI, Chaves RO, Feranti JPS, Costa CAS, Amaral AS do, Soares AV. Appendicular fractures of traumatic etiology in dogs: 955 cases (2004-2013). *Ciência Rural* 2016; 46(3): 542-546. Available from: <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20150219>
16. Vidane AS, Elias MZJ, Cardoso JMM, Come JASS, Harun M, Ambrósio CE. Incidência de fraturas em cães e gatos da cidade de Maputo (Moçambique) no período de 1998-2008. *Ciência Animal Brasileira* 2014; 15(4):490-494. Available from: <https://doi.org/10.1590/1089-6891v15i424279>
17. Figuera RA, Silva MCD, Souza TMD, Brum JS, Kommers GD, Graça DL, Irigoyen LF, Barros, CSLD. Aspectos patológicos de 155 casos fatais de cães atropelados por veículos automotivos. *Ciência Rural* 2008; 38(5):1375-1380. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000500028>
18. Beale B. Orthopedic clinical techniques femur fracture repair. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 2004; 19(3):134-150. Available from: <https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2004.09.006>
19. Kumar K, Mogha IV, Aithal HP, Kinjavdekar P, Singh GR, Pawde AM, Kushwaha RB. Occurrence and pattern of long bone fractures in growing dogs with normal and osteopenic bones. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 2007; 54(9):484-490. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0442.2007.00969.x>
20. Bennour EM, Abushhiwa MA, Ben Ali L, Sawesi OK, Marzok MA, Abuargob OM, Tmumen SK, Abdelhadi AW, Abushima MM, Benothman M, Said E, El-Khodery S. A retrospective study on appendicular fractures in dogs and cats in Tripoli-Libya. *Journal of Veterinary Advances* 2014; 4(3):425-431. Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/A-Retrospective-Study-on-Appendicular-Fractures-in-Bennour-Abushhiwa/bb4e483ef8a1d36f65db376dd5a13be3083671c9>
21. Minar M, Hwang Y, Park M, Kim S, Oh C, Choi S, Kim G. Retrospective study on fractures in dogs. *Journal of Biomedical Research* 2013; 14(3):140-144. Available from: <http://dx.doi.org/10.12729/jbr.2013.14.3.140>
22. Siqueira RC, Siragusi RH, Scorsato MF, Souza JB, Franco RP. Estudo retrospectivo da ocorrência de fraturas em ossos longos nos cães atendidos durante o período de 2006 a 2013 na universidade de Marília-SP/Brasil. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 2015; 10:94-98. Available from: http://www.fmv.ulisboa.pt/spcv/PDF/pdf6_2015/94-98.pdf
23. Cordey J. Introduction: Basic concept and definitions in mechanics. *Injury* 2000; 31:1-84. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0020-1383\(00\)80039-X](https://doi.org/10.1016/S0020-1383(00)80039-X)
24. Einhorn TA. Bone strength: The bottom line. *Calcified Tissue International* 1992; 51(5):333-339. Available from: <https://doi.org/10.1007/BF00316875>
25. Turner CH, Burr DB. Basic biomechanical measurements of bone: A tutorial. *Bone* 1993; 14(4):595-608. Available from: [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(93\)90081-K](https://doi.org/10.1016/8756-3282(93)90081-K)
26. Junqueira LCU, Carneiro J. Tecido ósseo. In: Junqueira LCU, Carneiro J. *Histologia básica*. 12th. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013; 131-148.
27. Jilka RL, Weinstein RS, Parfitt AM, Manolagas SC. Perspective: Quantifying osteoblast and osteocyte apoptosis: challenges and rewards. *Journal of Bone and Mineral Research* 2007; 22(10): 1492-1501. <https://doi.org/10.1359/JBMR.070518>

28. Heřt J, Fiala P, Petrářl M. Osteon orientation of the diaphysis of the long bones in man. *Bone* 1994; 15(3):269–277. Available from: [https://doi.org/10.1016/8756-3282\(94\)90288-7](https://doi.org/10.1016/8756-3282(94)90288-7)
29. Martin RB, Boardman DL. The effects of collagen fiber orientation, porosity, density, and mineralization on bovine cortical bone bending properties. *Journal of Biomechanics* 1993; 26(9):1047–1054. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(05\)80004-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(05)80004-1)
30. Martin RB, Lau ST, Mathews PV, Gibson VA, Stover SM. Collagen fiber organization is related to mechanical properties and remodeling in equine bone. A comparison of two methods. *Journal of Biomechanics* 1996; 29(12):1515-1521. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(96\)80002-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(96)80002-9)
31. Ramasamy JG, Akkus O. Local variations in the micromechanical properties of mouse femur: The involvement of collagen fiber orientation and mineralization. *Journal of Biomechanics* 2007; 40(4):910–918. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2006.03.002>
32. Currey JD. The structure and mechanics of bone. *Journal of Materials Science* 2012; 47(1):41-54. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10853-011-5914-9>
33. Hastings Gw, Ducheyne P. *Natural and living biomaterials*. 1st. ed. Boca Raton: CRC Press; 1984. Available from: <https://doi.org/10.1201/9781351074902>
34. Koester KJ, Ager JW, Ritchie RO. The true toughness of human cortical bone measured with realistically short cracks. *Nature Materials* 2008; 7(8):672–677. Available from: <https://doi.org/10.1038/nmat2221>
35. Vashishth D, Behiri JC, Bonfield W. Crack growth resistance in cortical bone: Concept of microcrack toughening. *Journal of Biomechanics* 1997; 30(8):763–769. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0021-9290\(97\)00029-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9290(97)00029-8)
36. Zimmermann EA, Launey ME, Barth HD, Ritchie RO. Mixed-mode fracture of human cortical bone. *Biomaterials* 2009. 30(29):5877-5884. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.06.017>