

DESENVOLVIMENTO DE UMA METODOLOGIA DE EXPOSIÇÃO DA ORELHA MÉDIA DO OUVIDO BOVINO PARA FIXAÇÃO DOS ELEMENTOS MEMBRANÁCEOS PARA ESTUDOS HISTOLÓGICOS

LARA BONATTO DIAZ¹; LUIZ FERNANDO MINELLO²; LUIS AUGUSTO XAVIER CRUZ³; ANA LUISA SCHIFINO VALENTE⁴; SABRINA KÖMMLING⁵; ISABELLA DIAS BARBOSA SILVEIRA⁶

¹UFPEL/FAEM/PPGZ – larabonatto05@gmail.com

²UFPEL/IB/DM – minellof@hotmail.com

³UFPEL/IB/DM – laugustocruz@gmail.com

⁴UFPEL/IB/DM – schifinoval@hotmail.com

⁵UFPEL/FAEM/PPGZ – sabrina14k@hotmail.com

⁶UFPEL/FAEM/DZ – barbosa-isabella@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

As raças de bovinos domésticos estão subdivididas em duas categorias principais com origens e diferentes características morfológicas que os incluem em duas espécies: *Bos taurus taurus*, também conhecidos como taurinos, e *Bos taurus indicus*, chamados de zebuínos. Essas duas categorias dominam a maioria dos rebanhos bovinos em todo o mundo (JORGE, 2013), sendo que, no Brasil o rebanho bovino é composto por impressionantes 224.602.112 cabeças (IBGE, 2021), dos quais aproximadamente 165 milhões são de origem zebuína e suas cruzas representando cerca de 75% desse rebanho nacional (BATTISTELLI, 2012).

É sabido que a comunicação entre animais, incluindo os bovinos, envolve emissões sonoras e sua interpretação (GRANDIN, 1998). No entanto, o entendimento da capacidade auditiva em animais de grande porte, como os bovinos, ainda é limitado, pois a maioria das pesquisas na área se concentra em pequenos mamíferos, principalmente roedores (HEFNER; HEFNER, 1983), excetuando o estudo de Soares (2005), em ovinos (*Ovis aries*) da raça Corriedale.

Além disso, é crucial compreender como os animais percebem o som para garantir seu bem-estar e conforto (AMES, 1972 p. 16). Os animais reagem a diferentes tipos de sons, que podem alcançar sua audição de maneiras diversas. Alguns sons têm efeito tranquilizante, enquanto outros podem indicar perigo e, ao longo do tempo, causar trauma. Por exemplo, os bovinos podem se sentir desconfortáveis em resposta a ruídos estranhos e perturbadores em seu ambiente (FRASER, 1974).

Na perspectiva de prosseguir os estudos da orelha de bovinos já realizados por Moreira e colaboradores (2018) e de Silveira (2023), na parte externa (pavilhão auricular e meato acústico) e com foco nas estruturas presentes na orelha média, em especial a membrana timpânica é necessário o desenvolvimento metodológico para acessar a área anatômica que é muito delicada e situada na parte petrosa do osso temporal. Desse modo, o objetivo deste estudo é desenvolver um método que permita a exposição dos elementos da câmara média da orelha bovina visando sua fixação para posterior desgaste e desmineralização óssea. O que possibilitará a análise da sua porção membranácea, em especial da membrana timpânica, bem como facilitará a compreensão de estudos posteriores de ossículos e avanço na cóclea já na orelha interna.

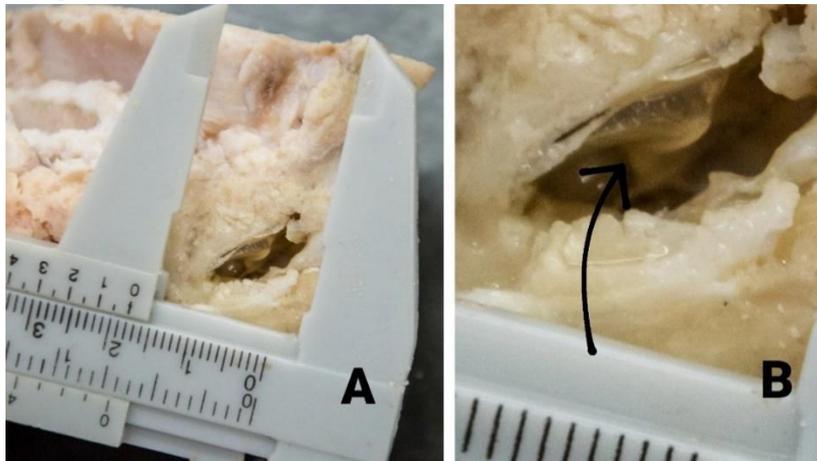
2. METODOLOGIA

O presente estudo iniciou em maio de 2023 e está em desenvolvimento no laboratório de Biologia Celular, Histologia e Anatomia do Desenvolvimento do Departamento de Morfologia, Instituto de Biologia localizado no Campus da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas (NULAB 90080). Para a avaliação histológica e anatômica foram utilizados 03 animais abatidos em frigorífico comercial, localizado no município de Pelotas, cumprindo todos os requisitos éticos, legais e sanitários de inspeção estadual do Rio Grande do Sul, Brasil. As cabeças foram serradas em serra fita e depois em serra manual de modo que restou somente o bloco do final do meato acústico externo e possível área coclear, incluindo a parte média da orelha. Posteriormente, foi realizada a remoção das porções moles (pele, músculos, ligamento, conjuntivo, adiposo) expondo a porção óssea ao máximo.

Paralelamente, para evitar a perda de segmentos anatômicos das orelhas direitas e esquerdas bovinas, foi utilizada uma cabeça de ovino (*Ovis aries*) procedente de outro estudo realizado no NULAB 90080, que foi destinada ao desenvolvimento de um estudo piloto, uma vez que apresenta menor porte e poderia se avaliar possíveis ajustes metodológicos. Essa amostra ovina chegou no laboratório sem a mandíbula, desse modo, em primeiro momento, a estrutura óssea do ouvido (esquerdo e direito) foi dissecada, com objetivo de expor a câmara média. Iniciou-se por um corte sagital, dividindo a cabeça em duas hemifaces. Posteriormente, realizou-se um corte transversal no osso frontal, posterior a órbita seccionando a sutura frontozigomática, em seguida removendo o cérebro. Para dar continuidade a dissecação, localizou-se o nervo vestibulococlear situado no osso temporal, onde com uma serra manual em arco foi traçada uma linha imaginária da abertura do meato até o nervo vestibulococlear, resultando em uma peça retangular. Com o auxílio de uma agulha histológica, introduziu-se na abertura do meato acústico em direção ao nervo, com o intuito de traçar um trajeto para a realização de novos cortes para expor a câmara média, então, novamente com o auxílio da serra manual, foram realizados novos cortes paralelos ao eixo do meato, resultando na exposição da câmara média deixando a peça no menor tamanho possível, com o intuito de diminuir o tempo de descalcificação. Essas amostras foram submetidas a descalcificação, sendo que o processo de desmineralização superou dois meses, o que inviabilizará a mesma pesquisa na orelha de bovinos, pois o que se quer estudar é a porção membranácea timpânica. O processo de montagem das lâminas descalcificadas de ovinos passou pelas etapas de neutralização, reidratação, seguida da desidratação, diafanização, inclusão em parafina, microtomia, coloração e montagem em entellan® o que pode levar de 24 a 48 horas até que as lâminas histológicas possam ser observadas na MO.

A partir dessa experiência com as peças de ovinos, passou-se aos cortes em bovinos seguindo os mesmos planos e foi atingida a câmara média e a membrana timpânica exposta (Figura 1), sendo as peças fixadas imediatamente para estudo de método de desgaste manual por abrasão visando diminuir a espessura dos componentes ósseos, e com isso o tempo de desmineralização para expor a porção membranácea e viabilizar a elaboração da dissertação de mestrado em tempo hábil.

Figura 1 – Acesso lateral da orelha média do bovino (A e B), com exposição da membrana timpânica indicada pela seta em B.



Fonte: Prof. Dr. Luiz Fernando Minello

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, a fixação das amostras foi realizada utilizando uma solução de formaldeído a 10% à temperatura ambiente. No entanto, no estudo conduzido por Soares (2005), observou-se que as amostras foram inicialmente armazenadas no refrigerador durante a primeira semana e, na segunda semana, foram inseridas à temperatura ambiente, ou então, mantidas no refrigerador, o que pode justificar os bons resultados dos cortes para as análises histológicas.

No que diz respeito à descalcificação das amostras provenientes das cabeças ovinas, utilizadas como teste piloto, foi necessário aguardar um período de 69 dias. Isso contrasta com os resultados de descalcificação obtidos no estudo de Soares (2005), onde o processo foi concluído em 49 dias. Vale ressaltar que, para a presente pesquisa, optou-se por utilizar uma solução de Ácido fórmico a 10% para a descalcificação, enquanto no estudo de Soares (2005), empregou-se Ácido tricloroacético a 5%.

A etapa de corte das amostras destinadas às análises histológicas do primeiro ouvido ovino revelou-se desafiadora devido à dificuldade da amostra, que se tornou endurecida. Acredita-se que esse fato tenha ocorrido devido ao período prolongado de imersão no xilol, que foi necessário à diafanização devido ao tamanho da amostra. Diante desse problema, foi necessário explorar alternativas metodológicas que possibilitassem o clareamento da amostra sem causar enrijecimento, o que implica em melhorar a eficiência da diafanização, para que ocorra em menor tempo possível. Nesse sentido, inspirado na abordagem proposta por Zhanmu et al. (2020), optou-se por substituir o xilol pelo clorofórmio nas próximas amostras que serão processadas, uma vez que, os autores obtiveram resultados melhores no tratamento de amostras grandes com essa substituição.

Além disso, é relevante notar que, ao contrário da pesquisa de Soares (2005), que empregou celoidina em diferentes concentrações no processo de emblocamento, a presente pesquisa utilizou parafina. Essa divergência metodológica também pode ter contribuído para as dificuldades durante o corte das amostras.

Com base no planejamento cuidadoso do plano de corte predefinido, foi viável atingir a câmara média das amostras designadas para teste, assim como, traçar o plano de corte necessário para a realização das análises microscópicas, utilizando a primeira amostra da cabeça de ovelha como ponto de partida (piloto). Embora tenham sido enfrentados desafios consideráveis devido à notável dificuldade dessa amostra, os resultados obtidos permitiram a exposição das porções membranáceas para sua fixação, permitindo os estudos histológicos necessários para o estudo da membrana timpânica bovina.

4. CONCLUSÕES

Conforme planejado, o plano de corte traçado mostrou-se eficiente ao permitir alcançar a câmara média das amostras permitindo sua fixação. O domínio dessa técnica permitirá prosseguir estudos adicionais para a redução das porções ósseas, facilitando sua desmineralização para exposição e subsequente estudo das porções membranáceas da orelha média e, futuramente interna.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMES, D., AREHART, L. Physiological response of lambs to auditory stimuli. **Journal of Animal Science**. V.34, p.994–998, 1972.
- BATTISTELLI, J.V.F. Alternativas de cruzamento utilizando raças taurinas adaptadas ou não sobre matrizes nelore para a produção de novilhos precoces. 2012.
- SILVEIRA, R.F. **Comportamento de bovinos de corte e sua relação com a audição**. 2023. Tese, (Doutorado especializado comportamento e bem-estar animal) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas.
- FRASER, A.F. **Farm animal Behaviour**. New York: Baillière Tindal, 1974. 196p.
- GRANDIN, T. The feasibility of using vocalization scoring as an indicator of poor welfare during slaughter. **Applied Animal Behaviour Science**, v.56, n.2, p.121-8, 1998.
- HEFFNER, R. S.; HEFFNER, H. E. Hearing in Large Mammals: Horses (*Equus caballus*) and Cattle (*Bos taurus*). **Behavioural Neuroscience**. v.97, n.2, p.299-309, 1983.
- IBGE. **Rebanho de Bovinos (Bois e Vacas)**. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Brasil. Acessado em 25 ago. 2023. Online. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/explica/producao-agropecuaria/bovinos/br>
- JORGE, W. A genômica bovina-origem e evolução de taurinos e zebuinos. **Vet. e Zootec**, v. 20, n. 2, p. 217-237, 2013.
- MOREIRA, S.M. Descrição anatomohistológica da orelha de bovinos de corte na sensibilidade auditiva e bem-estar animal. 2018.
- SOARES, H.B. O estudo histológico do osso temporal do ovino: uma contribuição para a caracterização da ovelha como modelo animal para tratamento e investigação experimental em otologia. 2005.
- ZHANMU, O. et al. Paraffin-embedding for large volume bio-tissue. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 12639, 2020.