



Angela Crimi e Anna Pascucci

Università degli Studi di Napoli Federico II

Ouriço-do-mar

Utilização didáctica do ouriço-do-mar para o estudo de fenómenos biológicos fundamentais

Objectivo

Graças às características biológicas do ouriço-do-mar é possível, na escola, com alguns instrumentos, percorrer o caminho do desenvolvimento histórico do conhecimento científico e experimentar descobrir um fenómeno biológico perfeito e fascinante: a desova e a observação de gâmetas, a interacção entre os gâmetas, a inseminação artificial, o desenvolvimento do embrião e o processo de hibridação.

Introdução

Os ouriços-do-mar têm sido utilizados como o organismo modelo para o estudo da embriologia desde o final do século XIX: Oscar Hertwig e Ernst H. Haeckel foram os primeiros a observar o fenómeno da fecundação, a fusão do espermatozóide com o óvulo, para formar uma célula do novo organismo. Theodor Boveri estudou duas espécies de ouriço-do-mar e concluiu que todos os cromossomas foram necessários para o desenvolvimento embrionário normal. Hans Driesch, da Stazione Zoologica de Nápoles, executou a primeira experiência na qual demonstrou a totipotência das células estaminais primitivas: ele separou os primeiros dois blastómeros do ouriço-do-mar e observou a formação de duas larvas completas

A utilização do Ouriço-do-mar na escola

Para a actividade didáctica utilizamos duas espécies diferentes de ouriço-do-mar: *Paracentrotus lividus* e *Arbacia lixula*.





Filo	<i>Echinodermi</i>
Classe	<i>Echinoidei</i>
Ordem	<i>Diadematoidei</i>
Família	<i>Echinidi</i>
Género	<i>Paracentrotus</i>
Espécie	<i>Paracentrotus lividus</i>



Filo	<i>Echinodermi</i>
Classe	<i>Echinoidei</i>
Ordem	<i>Diadematoidei</i>
Família	<i>Echinidi</i>
Género	<i>Arbacia</i>
Espécie	<i>Arbacia lixula</i>

A superfície é dura e o esqueleto rijo, formado por placas de calcário e é denominado de teca. O corpo é coberto de espinhos. O *Paracentrotus lividus* tem espinhos fortes, aguçados e finos, o *Arbacia lixula* tem espinhos longos e grossos.

O corpo tem uma simetria pentarradiada e tem pequenos pés ambulacrários com ventosas, que funcionam através de pressão hidráulica e que facilitam a locomoção, a captura de alimentos e a fixação ao fundo do mar. O orifício anal e o genital estão localizados na parte de cima do ouriço-do-mar. A boca assemelha-se a uma garra e está localizada na parte inferior; tem 5 lâminas que se assemelham a dentes virados para dentro e denominados de lanterna de Aristóteles. Os ouriços-do-mar comem plantas e matéria animal. Os óvulos ou esperma são libertados por cinco gonóporos.

A fecundação é externa. Os sexos são separados e não existe dimorfismo sexual. A espécie *Paracentrotus lividus* habita o Mediterrâneo e o Atlântico oriental da Escócia às Canárias.

Os *Arbacia lixula* habitam o Mediterrâneo e o Atlântico oriental ao longo da costa portuguesa.

Equipamento e materiais necessários para cada pessoa ou grupo

Instrumentos



- Microscópio estereoscópico com sistema de iluminação integrado para luz incidente e transmitida
- Microscópio
- Pipetas de Pasteur de vidro e de plástico
- Seringa
- Luvas

Materiais

- KCl (cloreto de potássio) 0.5 M
- lâminas com uma cavidade
- lâminas com duas cavidades
- lamelas
- 4 erlenmeyers (100 ml)
- 4 erlenmeyers (50 ml)
- 4 erlenmeyers (10 ml)
- tubos de ensaio
- varetas de vidro
- aquário ou tanque com filtro
- água do mar ou solução de sal do mar
- ventilador individual
- 10 *Paracentrotus lividus*
- 10 *Arbacia lixula*



Antes de começar

Sempre que trabalhar com ouriços-do-mar utilize luvas.

Conselhos para o transporte e preservação

Os ouriços-do-mar podem ser transportados num saco térmico ou numa caixa de poliestireno com gelo seco para que a temperatura dentro do recipiente esteja sempre baixa (4° C). É possível deixá-los durante um dia num frigorífico sem água. Após esse período devem de ser colocados num aquário para fauna marítima ou num recipiente com ventilação, sendo necessário mudar a água todos os dias.

Actividades de ensino

Actividade 1: Induzir a desova dos gâmetas

- 1 No período de máxima maturidade dos gâmetas é possível conseguir a desova dos gâmetas simplesmente abanando os ouriços-do-mar algumas vezes. Se esta operação não resultar, pode experimentar injeções de cloreto de potássio (KCl) até cerca de 1ml no celoma do ouriço-do-mar. É necessário ter cuidado para inserir a agulha da seringa nas partes laterais da boca da lanterna de Aristóteles. Abane ligeiramente os animais e passado alguns minutos será possível observar a cor dos gâmetas que se libertam. O cloreto de potássio causa a contracção dos músculos das gónadas e, por consequência, a desova dos gâmetas.
- 2 Se os gâmetas forem cor de laranja e cor-de-rosa (*Paracentrotus lividus*) ou de uma cor castanha avermelhada (*Arbacia lixula*) são óvulos e devem ser recolhidos num erlenmeyer com cerca de 100 ml de água do mar. Para tal, deve colocar os ouriços-do-mar ao contrário (o ânus deve estar virado para baixo).

Se os gâmetas forem de cor branco-sujo (*Paracentrotus lividus*) ou bege

(*Arbacia lixula*) são espermatozoides que devem ser recolhidos com um conta-gotas de vidro e colocados num tubo de ensaio em gelo. Este sémen "seco e não activo" pode ser conservado no frigorífico durante alguns dias à temperatura de 4°C. Assim que a desova dos gâmetas tiver terminado, pode colocar os ouriços-do-mar num aquário.



Actividade 2: Observação dos gâmetas

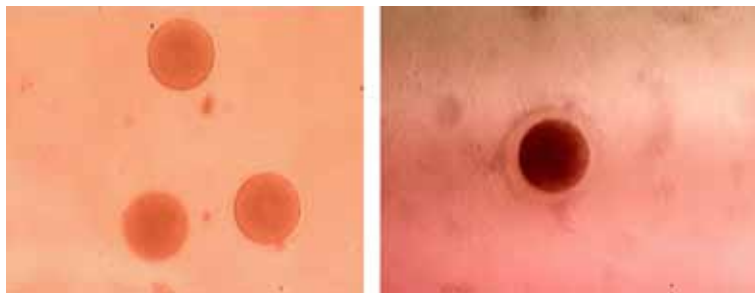
- 3 Os óvulos submersos na solução de água do mar irão flutuar até ao fundo. Mexa levemente a suspensão e retire algumas gotas com a pipeta de plástico (é possível reconhecer os óvulos ao olho nu). Neste momento, pode colocar os óvulos numa pequena placa de Petri e pode observá-los ao microscópio. Desta forma, poderá verificar o seu tamanho e forma.
- 4 De seguida, poderá estudá-los mais aprofundadamente: coloque uma gota da suspensão na cavidade da lâmina e cubra com uma lamela. De seguida, pode observar os óvulos com o microscópio óptico. Aconselha-se que os observe primeiro com uma ampliação menor. Depois pode colocar no campo de visão o objecto que pretende pesquisar e alternar as lentes para uma ampliação muito maior. Com uma ampliação de 400x pode ver o córtex com os grânulos corticais do núcleo do óvulo. Além disso, pode distinguir, graças às grandes dimensões do núcleo, os óvulos imaturos (oócitos primários) dos óvulos maduros prontos para a fertilização.
- 5 Para observar os gâmetas masculinos, coloque uma gota de suspensão na cavidade da lâmina de vidro e dilua uma pequena quantidade de esperma com 1 a 2 ml de água do mar. De seguida, coloque a lamela e observe ao microscópio óptico: com uma ampliação de 10 vezes começa a ver a forma que se assemelha a uma semente e o movimento espiral dos espermatozoides. Ao aumentar a ampliação, pode reconhecer melhor as suas partes: a cabeça e a cauda.
- 6 ATENÇÃO: Para evitar a contaminação, é necessário etiquetar e utilizar um conta-gotas diferente para fazer a suspensão dos óvulos e dos espermatozoides.

Actividade 3: Fecundação, observação da interacção óvulo-espermatozoides

- 7 Prepare a suspensão de espermatozoides, adequada para a fecundação, diluindo uma pequena gota de esperma com cerca de 5ml de água do mar (a cor deve ser quase branco-sujo). Esse esperma não pode ser guardado e deve utilizá-lo rapidamente já que a capacidade de fecundação diminui com o passar do tempo. Para que a experiência seja bem sucedida, aconselhamos a utilização de uma baixa concentração de esperma para reduzir a possibilidade de polispermia.

- 8 Agite a suspensão de óvulos, que têm tendência de ficar no fundo do copo, recolha uma gota com a pipeta de Pasteur de plástico e coloque-a na cavidade da lâmina de vidro.
- 9 Adicione lateralmente, na extremidade da lâmina de vidro, uma gota de suspensão de esperma (pipeta de vidro).
- 10 A fecundação desencadeia imediatamente um conjunto de eventos, sendo o mais significativo a formação da membrana de fecundação.
- 11 É possível seguir este interessante fenómeno. De facto, após alguns segundos, com uma ampliação pequena do microscópio, será fácil reconhecer os óvulos fecundados: estão rodeados por uma espécie de auréola. Com uma maior ampliação será possível acompanhar a interacção dos gametas: os pequenos espermatozoides com uma actividade frenética dirigem-se rapidamente na direcção do óvulo e competem pelo “grande óvulo”.

Actividade 4: observação do desenvolvimento embrionário de *Paracentrotus lividus*



- 12 Para esta actividade é preferível utilizar o *Paracentrotus lividus*, já que o seu óvulo é mais transparente do que o óvulo do *Arbacia lixula* e, portanto, é mais fácil visualizar o desenvolvimento do embrião.
- 13 Transfira 40ml da solução de óvulos e 1ml da suspensão de espermatozoides para o erlenmeyer de 50ml, abane cuidadosamente para ajudar ao contacto entre os gametas. Retire uma gota da suspensão em intervalos regulares e coloque-a delicadamente na cavidade de vidro para a observação ao microscópio.



- 14 Para uma oxigenação suficiente dos embriões é necessário, de vez em quando, substituir a solução de água do mar e abanar a suspensão para evitar a falta de oxigênio aos óvulos fertilizados(ou, alternativamente, coloque dentro do copo uma pequena pedra porosa usada na oxigenação de aquários). A duração da segmentação e, em geral, do desenvolvimento do embrião, depende da temperatura da água que deve estar entre 10 °C e 15 °C.
- o a 30 segundos após a inseminação: os espermatozoides ligam-se aos óvulos
 - Após 30 a 60 segundos: pode observar a formação da membrana de fecundação.
 - Após 30 a 50 minutos: pode observar a formação dos dois primeiros blastômeros.
 - Após cerca de 3 horas e meia: o embrião tem cerca de 64 células
 - Depois de cerca de 10 horas: a blástula tem cerca de 600 células
 - Depois de cerca de 20 horas: ocorre a fase de gástrula com a formação de arquêntero.
 - 48 horas depois: pode observar a larva, denominada de plúteo.

Actividade 5: Cruzamento entre duas espécies diferentes

Para esta experiência utilize uma lâmina com duas cavidades:

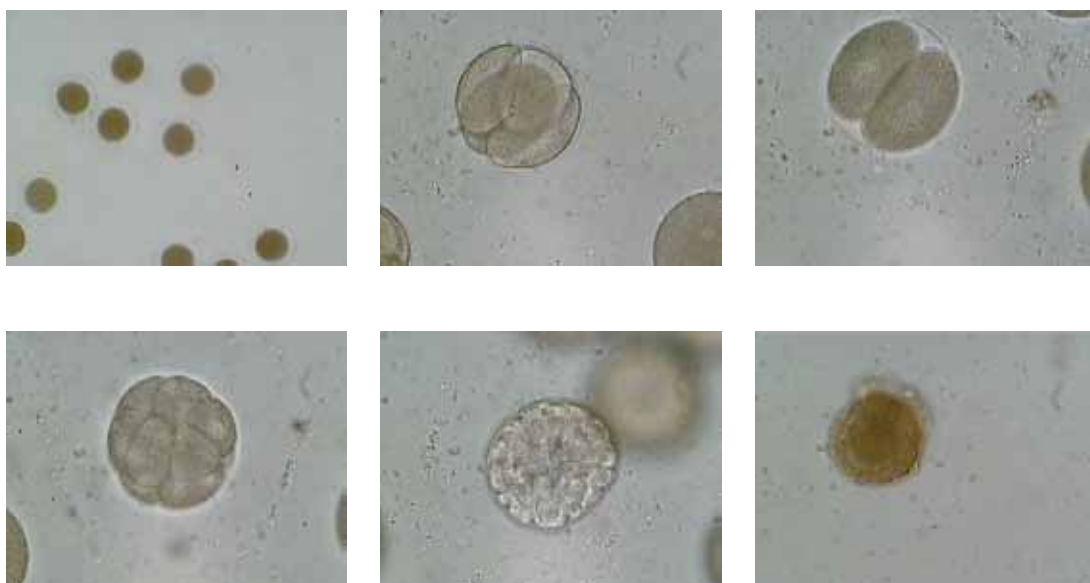
Coloque uma gota da suspensão de óvulos de *Arbacia lixula* numa concavidade, e na outra coloque uma gota de suspensão de óvulos de *Paracentrotus lividus*.

Adicione uma pequena gota de suspensão de espermatozoides da espécie oposta em ambas as cavidades; Será possível observar que:

Os espermatozoides de *Paracentrotus lividus* não conseguem fecundar os óvulos de *Arbacia lixula*.

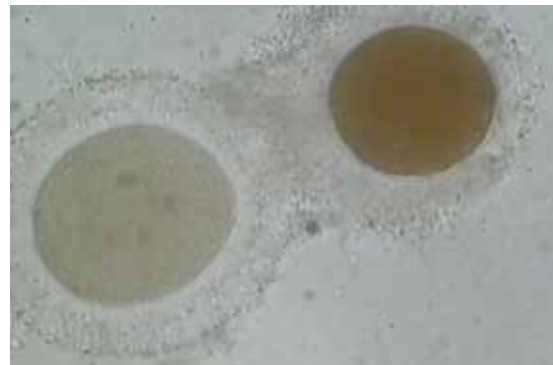
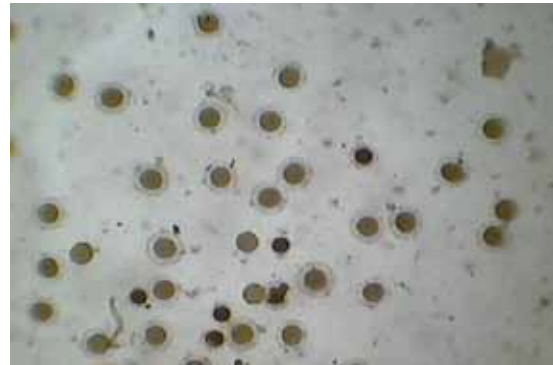
Os espermatozoides de *Arbacia lixula* conseguem fecundar os óvulos de *Paracentrotus lividus*.

Misture uma gota de suspensão de óvulos de *Arbacia lixula* e uma gota de suspensão de óvulos de *Paracentrotus lividus* numa cavidade da lâmina. Adicione a suspensão de espermatozoides de *Arbacia lixula*.



Será possível observar o seguinte:

- Os espermatozoides de *Arbacia lixula* conseguem rapidamente fertilizar os óvulos de ambas as espécies
- Num erlenmeyer de 50ml misture metade da suspensão de óvulos de *Arbacia lixula* e metade da suspensão de óvulos de *Paracentrotus lividus*. De seguida adicione a suspensão de espermatozoides de *Arbacia lixula*. Poderá observar que os óvulos fecundados de *Paracentrotus lividus* não conseguem completar o desenvolvimento embrionário; em especial irá notar que quase todos irão abortar na primeira fase do desenvolvimento.



Tempo

Estas actividades demoram cerca de 3 horas ou mais.

Referências bibliográficas

<http://www.stanford.edu/group/Urchin/contents.html>

<http://raven.zoology.washington.edu/celldynamics/downloads/urchinlab.html>

<http://www.marymt.edu/~hoegler/biolab/devbio/seaurch.html>



Agradecimentos

Este protocolo prático foi adaptado para o projecto Volvox, financiado ao abrigo do 6º Programa-Quadro da Comissão Europeia.