

IDENTIFICAÇÃO DA DINÂMICA DO DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS FASES EMBRIOLARVAIS DO OURIÇO DO MAR *ECHINOMETRA LUCUNTER*: MAIOR PRECISÃO PARA OS TESTES DE TOXICIDADE

Núbia Costa Nascimento¹

Resumo

Testes embriolarvais de ouriço do mar são amplamente utilizados para estimar os efeitos biológicos dos contaminantes nos ecossistemas marinhos. Devido às escassas informações sobre o desenvolvimento embriolarvais de *Echinometra lucunter* e a necessidade de fornecer confiabilidade aos testes de estágios iniciais da vida desta espécie, este trabalho teve como objetivo elucidar o tempo e a caracterização de cada fase embrionária e larval de desenvolvimento desta espécie. O tempo decorrido entre a fecundação e o início de cada uma das quatro primeiras clivagens e o alcance dos estágios de mórula, blástula e gástrula foram determinados por meio de bioensaios de 36h, sob 27°C. A membrana de fertilização apareceu cerca de 30 segundos após a fertilização. Embora os lotes de ovos frequentemente mostrassem variação no período entre a fertilização e a primeira clivagem, seus estágios subsequentes foram alcançados de forma homogênea. O desenvolvimento larval foi caracterizado pelo aparecimento de 1, 2, 3 e 4 pares de braços, respectivamente, nos tempos de 24, 36, 168 e 264 horas após a fertilização. O ovo tinha um diâmetro de 82µm em média, enquanto no 23º dia após a fertilização, as pós-larvas metamorfoseadas atingiram, em média, um diâmetro de 432µm. Os resultados forneceram dados importantes para apoiar a escolha de endpoints apropriados, que podem dar mais confiabilidade aos testes de desenvolvimento embriolarvais que utilizam essa espécie.

Palavras-chave: Ouriço do mar, *Echinometra lucunter*, embriotoxicidade, embriolarval.

¹ Mestre em Ecologia e Biomonitoramento pela Universidade Federal da Bahia – BA Professora do Instituto Federal da Bahia – IFBA.
E-mail: nbacosta@ifba.edu.br

Introdução

Os membros mais conhecidos do Filo Echinodermata são as estrelas do mar, os pepinos do mar e os ouriços do mar, sendo totalmente diferentes dos demais invertebrados no que diz respeito à formação do celoma, à ocorrência de clivagem radial do ovo e à presença de um endoesqueleto calcário de origem mesodérmica (MELLO, 1989). Entretanto, o desenvolvimento inicial dos equinodermos e dos cordados é muito semelhante quanto à formação do mesoderma, do celoma e da deuterostomia, o que sugere que estes grupos tiveram um antepassado comum (RUPPERT et al., 2005). Tanto para vertebrados (SATO, 1985), quanto para invertebrados (MATSUMOTO et al., 1998), eventos em morfogênese e diferenciação se iniciam em um tempo que depende do alcance de certas condições fisiológicas, que por sua vez, são influenciadas por parâmetros ambientais. O início de cada evento do desenvolvimento embriolarval e sua duração pode depender do alcance de uma determinada relação núcleo/ citoplasma (NEWPORT; KIRSCHNER, 1982), do número de replicações do DNA (SATO; IKEGAMI, 1981; SOLL, 1983) ou da flutuação no conteúdo de radicais SH- em certas proteínas (DAN; IKEDA, 1971), nas células em divisão; mas, até certo ponto, as relações desenvolvimento/ tempo podem ser bastante repetitivas e previamente estabelecidas para cada espécie. Como as respostas a estressores dependem das condições fisiológicas dos organismos testes, torna-se importante definir, para o organismo selecionado, o tempo de duração e a identificação de cada fase do desenvolvimento, no sentido de definir início e endpoint dos testes, para dar mais realismo às estimativas e prover maior proteção ao ambiente (MATSUMOTO et al., 1998).

A metamorfose sofrida pela larva plúteus, por exemplo, é uma das etapas mais intrigantes do desenvolvimento dos ouriços. Segundo TOMMASI, (1966), a larva equinoplúteus dos Echinoidea é a que apresenta maior diversidade de formas entre os Echinodermata. Apesar de ser amplamente estudada, as informações a ela relativas, de modo geral, se direcionam aos aspectos bioquímicos e citogenéticos, sendo poucos os dados divulgados sobre tempo de duração desta etapa e suas respectivas características morfológicas; no caso da espécie *E. lucumter*, além desta fase, não são conhecidos os "timings" das fases do desenvolvimento embriolarval, importantes por serem relacionados a endpoints nos testes de toxicidade (NASCIMENTO et al., 2002).

Devido à facilidade de se obter gametas, e de se conseguir a fertilização *in vitro*, os ouriços-do-mar têm sido utilizados pelo mundo inteiro em

bioensaios embriolarvais (BEIRAS et al., 2001). O que caracteriza um teste ecotoxicológico como uma boa ferramenta de avaliação ambiental, além do domínio da técnica, é o conhecimento da espécie. Este conhecimento abrange a ecologia do organismo, envolvendo não apenas sua interação com o ambiente, mas dados relativos a todas as fases de vida. Portanto, o estudo do desenvolvimento embriolarval auxilia a interpretação dos resultados obtidos em ensaios e enriquece o “pool” de informações existentes. No caso da espécie *E. lucunter*, este estudo é o primeiro a abordar estes aspectos, de importância fundamental para a precisão dos testes de toxicidade.

Metodologia

2.1- Obtenção dos embriões

Os ouriços-do-mar adultos foram coletados nas praias do Farol da Barra e Porto da Barra da cidade de Salvador, Bahia, Brasil, em uma área considerada livre de poluentes industriais ou de efluentes domésticos (NASCIMENTO, 2005). Para a obtenção dos gametas seguiu-se o método descrito por MENDES et al. (2018), onde 0,5ml da solução de KCl a 0,5M foi injetada na região perioral do organismo, estimulando a liberação dos gametas. Existem várias abordagens descritas na literatura, contudo, para a indução das posturas, no caso do ouriço do mar, a mais eficiente é o choque osmótico descrito por Gago et al., (2009). Os embriões foram obtidos misturando-se 1ml da suspensão de espermatozóides para cada 100ml de uma suspensão espessa de óvulos.

2.2 - Bioensaios

Para descrever as etapas do desenvolvimento embriolarval até metamorfose, da espécie *E. lucunter*, foram realizados 5 bioensaios com o objetivo de identificar e situar temporalmente as principais mudanças morfológicas ocorridas. Um primeiro bioensaio foi realizado com observações, de 8 em 8 horas, quando os embriões eram fixados, (formol a 10% em água, v/v, tamponado com bórax), e fotografados. Após se determinar os principais estágios de desenvolvimento, outros testes foram realizados, com observações a cada 6 horas, 3 horas e 1 hora, num período de 48 horas. Os ensaios foram realizados em triplicatas, em recipientes contendo 100ml de água do mar (NASCIMENTO et al., 2002), com uma densidade de 20 embriões/ml, sob salinidade 35, pH 8,0, OD >4,1 e temperatura 27 ±

1°C e um fotoperíodo de 12 horas claro/ 12 horas escuro. Nos primeiros 4 testes, realizados em períodos de 48 horas, os organismos expostos não foram alimentados.

Através das fotos, os estágios foram identificados e interpretados com base em observações e bibliografia especializada. Nestes ensaios as larvas consideradas anormais foram desprezadas. As etapas do desenvolvimento larval até pós-metamorfose foram acompanhadas por um período de 576 horas (24 dias), através de um outro teste, realizado com duas réplicas. O ensaio foi realizado em aquários, contendo 8 litros de água do mar, inicialmente com uma densidade de 10 embriões/ml, sob salinidade 34 ± 1 , pH $8,1 \pm 0,5$, OD $> 4,0$, temperatura $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e o fotoperíodo de 12 horas claro/ 12 horas escuro. As larvas passaram a ser alimentadas após 48 horas. O alimento diário consistia de microalgas das espécies *Isochrysis galbana*, *Chaetocerus gracilis* e *Chaetocerus calcitrans*, sendo fornecidos 2 ml de cada tipo estando as mesmas numa densidade de 25×10^5 células/ml, procedimento este sugerido por Tavares e Rocha (2001). A água utilizada nos aquários era parcialmente (50%) trocada a cada 72 horas. Após 48 horas foi introduzida uma leve aeração e, no fundo de cada aquário, foi colocado um substrato rochoso.

O crescimento das larvas foi acompanhado, diariamente, através da medição do comprimento do braço posterior de 50 larvas; nestes ensaios as larvas consideradas anormais foram desprezadas. Durante este teste, os organismos foram observados, medidos e fotografados a cada 24 horas, e os estágios foram identificados e interpretados, com o auxílio de bibliografia especializada.

Resultados e discussão

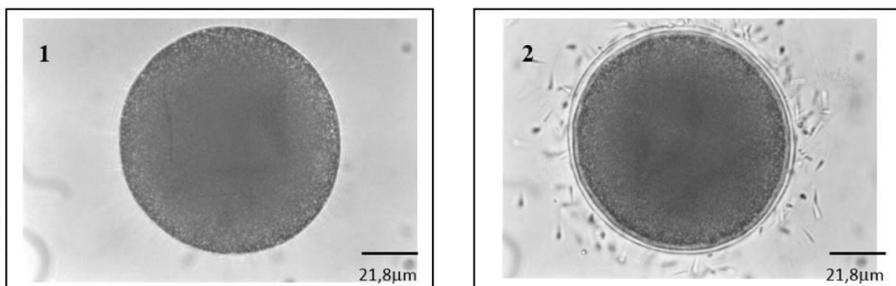
3.1 Caracterização do desenvolvimento embriolarval: formação da larva Plúteus.

Um dos pontos críticos para a prática de obtenção de embriões viáveis é o conhecimento do diâmetro dos óvulos maduros. Os ovos dos equinodermos têm um tamanho que varia de 60 a 200µm de diâmetro, contudo já foram observadas espécies que possuem ovos acima de 0,5 mm de diâmetro (TYLER & TYLER, 1966). Essa variação pode ser significativa em ovos de ouriços de um mesmo gênero, como ocorre com, *Heliocidaris erythrogramma* e *H. tuberculata* que possuem respectivamente ovos de 400 e 95µm (THOMAS et al., 2001), ou não, como ocorre com o gênero *Echinometra*, em que a *Echinometra vanbrunti* e *E. viridis*

possuem ovos com diâmetro de 70 e 91 μ m, respectivamente (LEVITAN, 2000), enquanto que os ovos da *Echinometra lucunter* tiveram um diâmetro médio de 82 μ m, confirmando-se, com o presente trabalho, dados anteriormente obtidos por outros autores (LEVITAN, 2000; THOMAS et al., 2001; BOLTON; THOMAS, 2002) para a espécie.

O óvulo possui uma membrana vitelina que envolve a membrana plasmática (Fig. 1). No momento da fecundação, um processo na região cortical do óvulo permite que a membrana vitelina se separe da membrana plasmática, passando a ser denominada "membrana de fecundação" (Fig. 2).

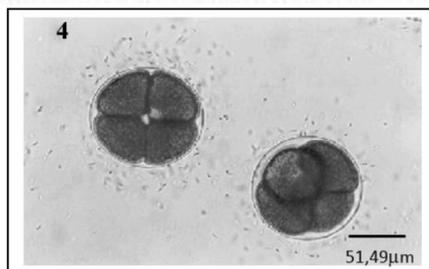
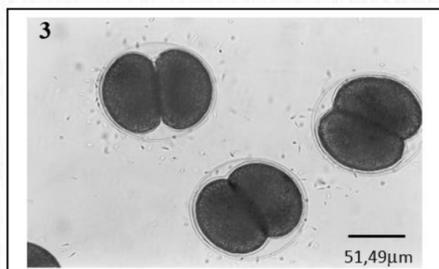
Figuras – 1 Óvulo do ouriço-do-mar *Echinometra lucunter* (Objetiva 40x / ocular 15x). **2** Óvulo e espermatozóides. Trinta segundos após a fusão dos gametas, a membrana de fecundação já pode ser observada (Objetiva 40x / ocular 15x).



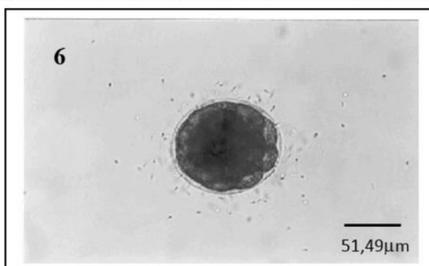
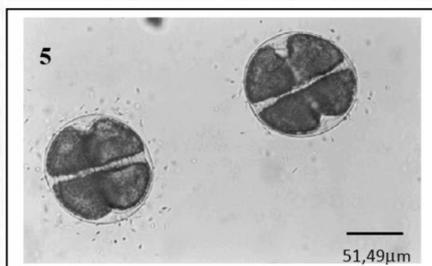
Esse processo visa impedir que outros espermatozóides penetrem no óvulo causando poliespermia (GÁRCIA; FERNÁNDEZ, 2003). A membrana de fecundação da espécie *E. lucunter* pode ser observada de 10 a 30 segundos, depois que os espermatozóides e os óvulos são postos em contato, por mistura das suspensões de gametas.

Enquanto o zigoto da espécie *Hemicentrotus pulcherrimus*, sob a temperatura de 20°C e com a remoção da membrana de fecundação por métodos químicos, leva aproximadamente 5 minutos para a concretização da primeira clivagem (MATSUMOTO et al., 1998), a espécie *Lytechinus variegatus*, sem a remoção da membrana leva de 20-30 minutos, a *Anthocidaris crassispina*, leva 60 minutos. Apesar de expostos a uma temperatura dentro da mesma faixa (25 a 28°C) utilizada para estas duas espécies de ouriços do mar, os zigotos de *Echinometra lucunter* levaram entre 60-90 minutos, após o aparecimento da membrana de fecundação, para completar a primeira clivagem (Fig. 3). Com duas horas pode-se observar a segunda divisão (Fig. 4); com três, pode-se verificar a terceira divisão (Fig. 5) e com quatro horas, o embrião já se apresenta no estágio de mórula (Fig.6 e 7).

Figuras –3 Primeira divisão, uma hora após a fecundação (Objetiva 20x / ocular 15x). **4** Segunda divisão, duas horas após a fecundação (Objetiva 20x / ocular 15x).



Figuras – 5 Terceira divisão, duas horas e meia após a fecundação (Objetiva 20x / ocular 15x). **6** Estágio de mórula após três horas da fecundação (Objetiva 20x / ocular 15x).



Apesar de existir um plano geral de desenvolvimento embriolarval dos ouriços-do-mar, ainda assim, existem pequenas diferenças entre as espécies como, por exemplo, o tempo de desenvolvimento do embrião em larva plúteus (Tabela 1).

Tabela. 1 - Espécies de ouriços e seus respectivos tempo para a formação dos embriões em larvas plúteus.

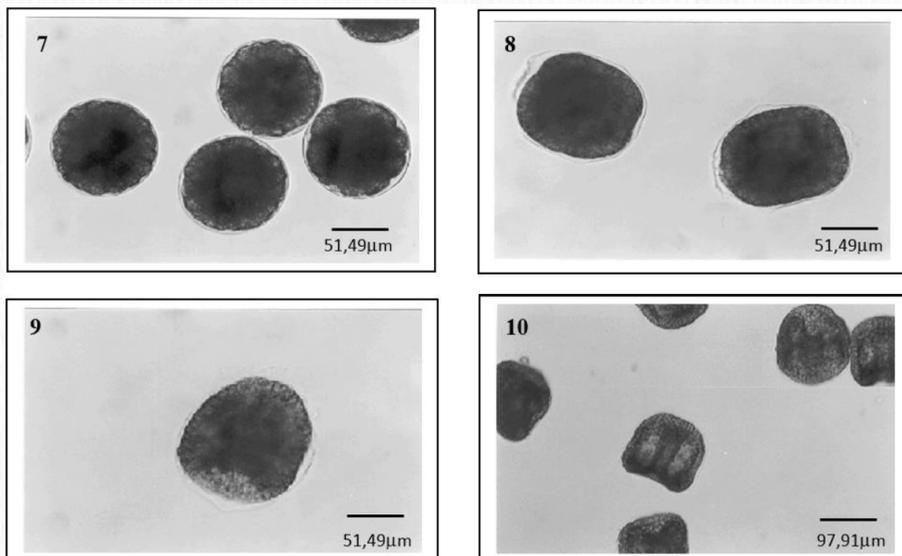
Espécies	Tempo para formação da larva plúteus	Temperatura	Referências
<i>Temnopleurus toreumaticus</i>	20 horas	20-25°C	Lee; Xu, 1984
<i>Lytechinus variegatus</i>	24 horas	25°C	Prósperi; Araújo, 2002
<i>Anthocidaris crassispina</i>	27-30 horas	26-28°C	Kobayashi; Okamura, 2004
<i>Echinometra lucunter</i>	36 horas	27-28°C	Este estudo
<i>Paracentrotus lividus</i>	72 horas	20°C	Beiras et al., 2001
<i>Sphaerechinus granularis</i>	96 horas	25°C	Quiniou et al., 1998
<i>Strongylocentrotus purpuratus</i>	96 horas	15°C	Phillips et al., 2003

Estes estágios são influenciados principalmente pela temperatura sendo que, consideradas as condições em que o organismo está adaptado, quanto menor for à temperatura, mais lento é o processo de clivagem (SEWELL & YOUNG, 1999). A dependência da temperatura no “timing” das primeiras clivagens, início do movimento ciliar e da gastrulação foi estabelecida por MATSUMOTO et al., (1998), para o ouriço *Hemicentrotus pulcherrimus*. Sob a mesma temperatura, dois “timers” foram reconhecidos, o primeiro controlando o ciclo de divisões e o movimento ciliar, do início da fecundação até a sétima clivagem, e um segundo ciclo, começando entre a oitava e nona clivagem, relacionado à invaginação das células mesenquimais na blástula, marcando o início da gastrulação.

Nas três primeiras clivagens, a segmentação é igual e radial. O ritmo das divisões sucessivas depende da quantidade de substância de reserva do ovo (KOBAYASHI; OKAMURA, 2004). Uma célula se multiplica, tanto mais rápido, quanto menor for sua quantidade de vitelo. Os ovos dos ouriços-do-mar são classificados como oligolécitos, ou seja, pobres em vitelo (GÁRCIA; FERNÁNDEZ, 2003). Após as sucessivas divisões celulares, inicia-se a formação da blástula (Fig. 8); neste estágio, o embrião adquire cílios, apresentando um movimento de rotação dentro da membrana de fecundação (MELLO, 1989). Esta membrana se rompe, liberando o embrião, que passa a nadar livremente; é através do movimento ciliar que o embrião nada e se alimenta (RODRIGUEZ, 2002). Exposta a uma temperatura de 27°C, a espécie *E. lucunter* atinge este estágio com aproximadamente 9 horas, após a fecundação.

Durante a gastrulação, os folhetos sofrem uma invaginação, formando um arquêntero (intestino primitivo), dando origem a gástrula. Neste estágio o embrião apresenta uma simetria bilateral, tornando-se ligeiramente cônico (Fig. 9 e 10) e a espécie *E. lucunter* atinge este estágio em aproximadamente 15 horas, após a fecundação.

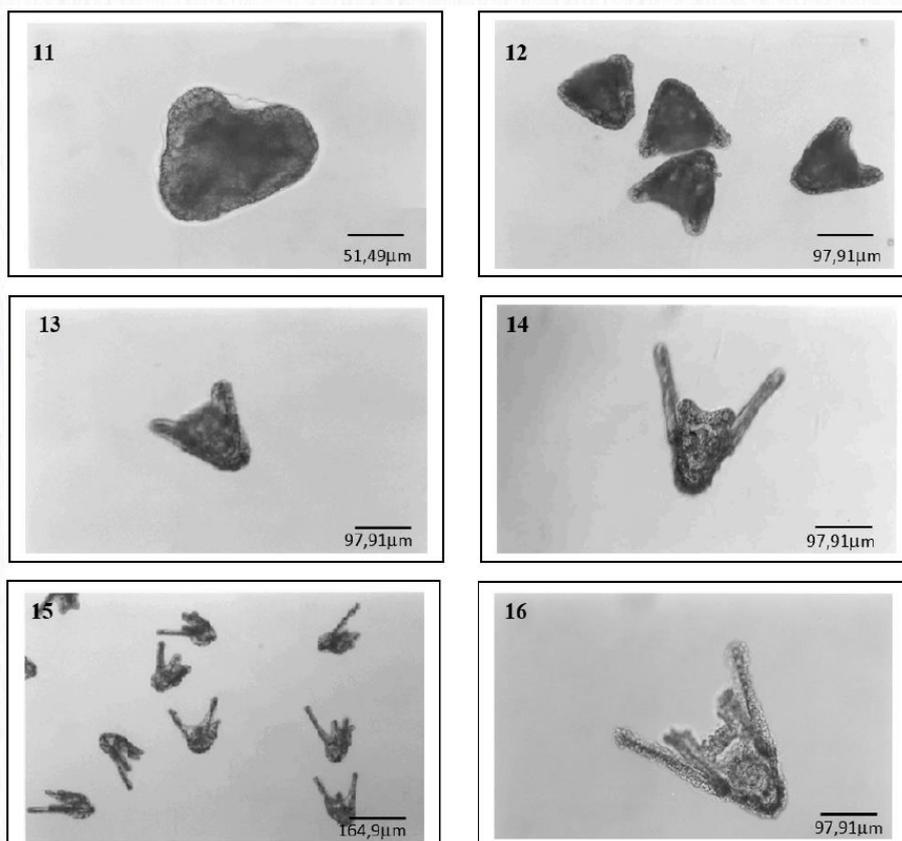
Figuras - 7 Estágio de mórula após seis horas da fecundação (Objetiva 20x / ocular 15x). 8 Nove horas de desenvolvimento; neste período os embriões já apresentam movimento livre- natante (Objetiva 20x / ocular 15x). 9 Embrião com doze horas, em processo de formação da gástrula (Objetiva 20x / ocular 15x). 10 Embriões com quinze horas, gástrula formada (Objetiva 10x / ocular 15x).



Após o estágio de gástrula o embrião começa a se desenvolver em larva plúteus, apresentando uma forma triangular, que alguns autores denominam como estágio de pré-plúteus (Fig. 11). O desenvolvimento posterior envolve a formação de projeções delgadas (braços), provenientes da parede corporal, caracterizando o estágio da larva plúteus (FRANSOZO; FRANSOZO-NEGREIRO, 2018) (Fig. 12). Vinte e quatro horas após a fecundação (1 dia), as larvas do ouriço-do-mar *E. lucunter* já apresentam os braços posteriores, ou braços anais, em desenvolvimento, tendo a larva um comprimento médio de 152µm (Fig. 12).

Os dois braços posteriores, também denominados braços anais, se desenvolvem mais, enquanto os anteriores, denominados braços orais, apresentam um crescimento discreto (Fig. 13 e 14); a larva da *E. lucunter* está com 36 horas de desenvolvimento, quando os braços anais atingem um comprimento maior que o corpo do organismo. Depois que os braços posteriores estão bem desenvolvidos, os anteriores, que antes estavam unidos, se separam de forma parcial e apresentam também um crescimento (Fig 15 e 16), após um período de 48 horas, desde a fecundação.

Figuras - 11 Embrião com vinte e uma horas, apresenta o formato de pré-plúteus, adquirindo a forma inicial de larva plúteus(Objetiva 20x / ocular 15x). **12** Larvas de *E. lucunter* com vinte e quatro horas (Objetiva 10x / ocular 15x). **13** Larvas com vinte e sete horas, braços posteriores, ou anais, curtos (Objetiva 10x / ocular 15x). **14** Larva equinoplúteus, com trinta e seis horas (Objetiva 10x / ocular 15x). **15** Larvas equinoplúteus com trinta e seis horas de desenvolvimento (Objetiva 4x / ocular 15x). **16** Larva com quarenta e oito horas de desenvolvimento (Objetiva 10x / ocular 15x).

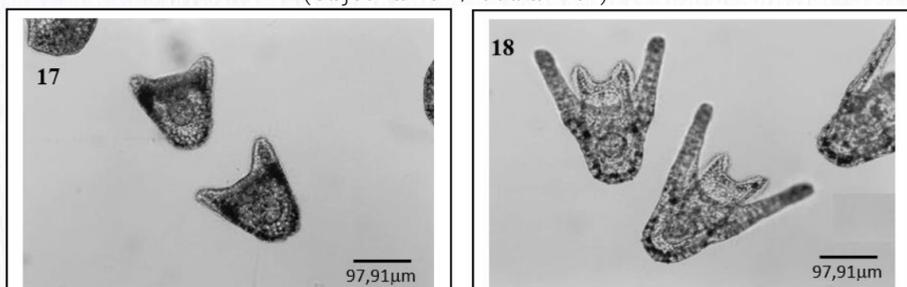


Na fase em que as larvas de ouriço-do-mar possuem quatro braços (os posteriores, com um comprimento médio de 245 m), a superfície do corpo é recoberta por cílios bem evidentes, associados à nervos que lhes permitem gerar correntezas para capturar partículas alimentares, conduzidas até a boca (RODRIGUES, 2002). Nesta fase apresentam uma estrutura sustentada por espículas, que darão origem ao esqueleto calcáreo (FRANSOZO; FRANSOZO- NEGREIRO, 2018).

3.2 Caracterização do desenvolvimento larval: das larvas Plúteus à metamorfose

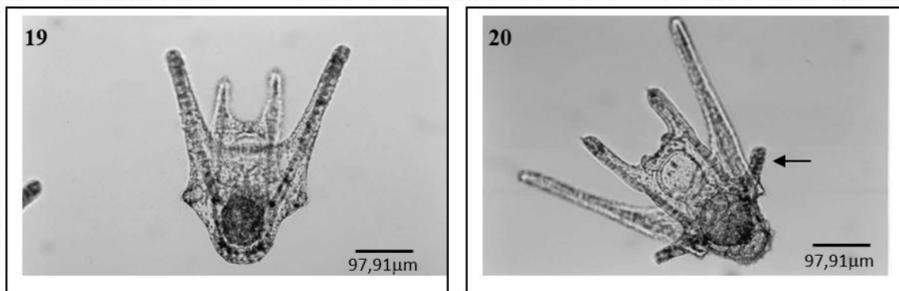
Neste período, o crescimento das larvas foi avaliado pelo comprimento dos braços posteriores, que tem servido de base comparativa em pesquisas com estes organismos e que, por guardar uma relação com o corpo da larva, é uma informação significativa (BEIRAS et al., 2001). A espécie *Echinometra lucunter* apresenta um comprimento médio de 250µm, quando exposta a 27°C por 48 horas. Comparativamente, a espécie *Paracentrotus lividus* é maior, apresentando um comprimento médio de 300µm, quando exposta a 20°C por 48 horas (BEIRAS et al., 2001; RODRIGUEZ, 2002). Na larva de *Echinometra lucunter*, com idade aproximada de trinta e seis horas, os braços anteriores começam a se desenvolver, sendo que com quarenta e oito horas (dois dias) já são visíveis (Fig. 18). A larva continua o seu crescimento tendo os braços posteriores, neste momento, um comprimento médio de 250µm. Para *Echinometra lucunter*, no período entre 48 e 96 horas pós fecundação, não houve uma mudança morfológica significativa, as alterações sendo manifestadas apenas como crescimento, estando, neste momento, o braço posterior com um comprimento de 341µm.

Figuras: 17 Larvas de *E. lucunter* com 1 dia (24 horas). Apenas os braços posteriores estão em desenvolvimento. Comprimento médio do braço posterior 152µm (Objetiva 10x / ocular 15x). **18** Larvas com 2 dias (48 horas). Braços anteriores e posteriores em desenvolvimento. Comprimento médio do braço posterior 250µm (Objetiva 10x / ocular 15x).



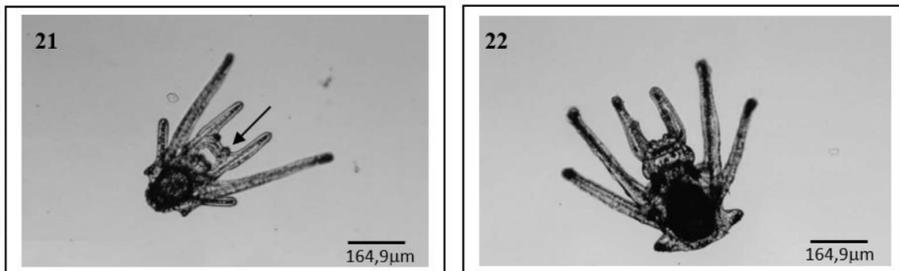
No quinto dia, 120 horas após a fecundação, pôde-se observar que, parte do tecido lateral sofreu um intumescimento ficando mais conspícuo (Fig. 19), sendo que no sétimo dia (168 horas) já se observa o terceiro par de braços, localizado entre os braços orais e anais, e o início do crescimento do quarto par de braços, localizado próximo aos braços orais (Fig. 20 e 21). Neste período os braços posteriores, ou anais, estão com um comprimento médio de 363 e 457µm, no quinto e no sétimo dia, respectivamente.

Figuras: 19 Larva com 5 dias (120 horas). Braços orais desenvolvidos e tecido entre os braços orais e anais com uma conspicuidade. Comprimento médio do braço posterior 363 μ m (Objetiva 10x / ocular 15x). **20** Larva com 7 dias (168 horas). Presença do terceiro par de braços. Comprimento médio do braço posterior 457 μ m (Objetiva 10x / ocular 15x).



As larvas que foram medidas estavam numa mesma fase de desenvolvimento, sendo que em um mesmo pool, se encontravam larvas em diferentes estágios. Apresentaram um crescimento significativo do braço posterior entre o primeiro e oitavo dia. Este período também se caracterizou pela ocorrência de mudanças morfológicas sincrônicas entre as larvas. Após o oitavo dia, os organismos diminuíram o crescimento do braço posterior, mas desenvolveram outras estruturas, além de, provavelmente, acumular reservas para a metamorfose. Neste período as mudanças que ocorriam nas larvas se tornaram menos sincrônicas, sendo encontradas, no décimo quinto dia, larvas com até 4 dias de desenvolvimento de diferença.

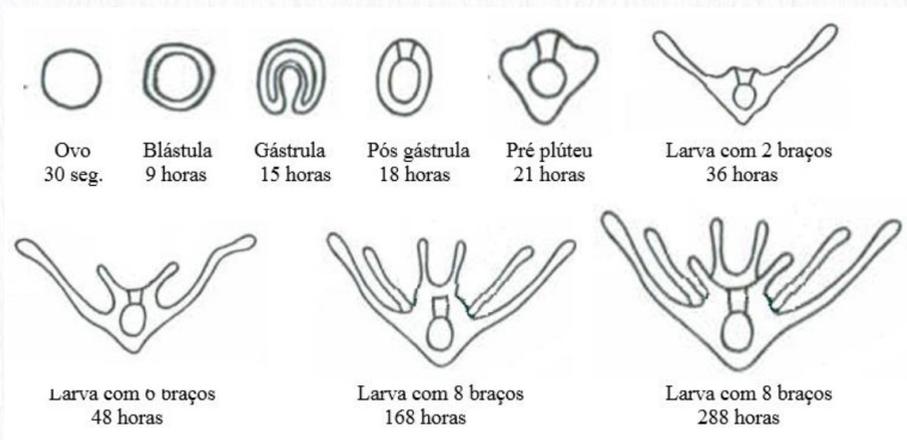
Figuras: 21 Larva com 8 dias (192 horas). Os três pares de braços e início do desenvolvimento do quarto par. Comprimento médio do braço posterior 498 μ m (Objetiva 4x / ocular 15x). **22** Larva com 12 dias (288 horas). Achatamento da região apical, braços desenvolvidos e presença do quarto par de braços, próximos aos braços o riais. Comprimento médio do braço posterior 535 μ m (Objetiva 4x / ocular 15x).



Do oitavo ao décimo primeiro dia a larva sofre gradativamente um leve achatamento na região apical, sendo que neste tempo, o quarto par de braços já pode ser observado, este bem menor e mais sutil que os outros braços (Fig. 22).

As alterações morfológicas ocorridas desde a fecundação até o aparecimento do quarto par de braços podem ser visualizadas na figura 23.

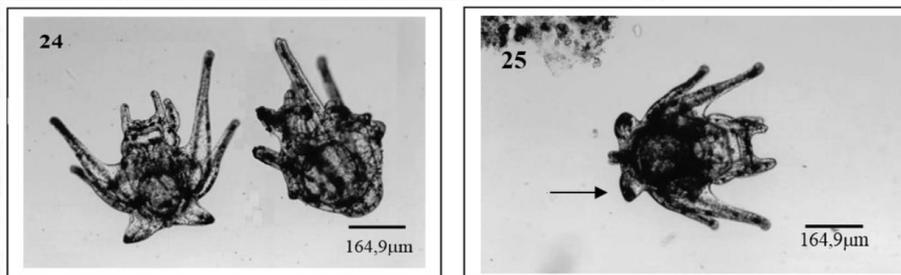
Figura 23 – Esquema do desenvolvimento embriolarval do ouriço-do-mar *E. lucunter*.



Adaptado de: Mello, R. A: Embriologia Comparada e Humana.

No décimo quarto dia (336 horas) as larvas apresentavam o “corpo” com um formato esférico, quando observadas lateralmente (Fig. 24). A partir do décimo quarto dia os braços posteriores não puderam ser medidos devido às mudanças morfológicas adquiridas pelas larvas, que não possibilitavam uma posição confiável para que a medição fosse realizada.

Figuras: 24 Larva de *E. lucunter* com 14 dias (336 horas). Quatro pares de braços desenvolvidos. Vista frontal e lateral (Objetiva 4x / ocular 15x). **25** Larva com 16 dias (384 horas). Aparecimento de uma estrutura na região apical (Objetiva 4x / ocular 15x).

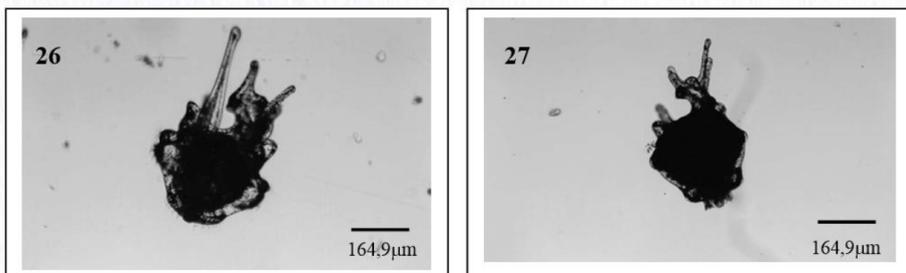


No décimo sexto dia (384 horas) uma nova estrutura, na região achatada, começou a se desenvolver, apresentando um movimento de abrir e fechar; neste período a quantidade de pigmentos produzida pelo organismo modifica sua condição de translúcido para opaco (Fig. 25).

A partir do décimo oitavo dia, as mudanças morfológicas apenas são realçadas; as larvas se tornaram mais escuras devido à quantidade de pigmentos, o "corpo" se tornou mais esférico e os movimentos se tornaram extremamente reduzidos, sendo mais comum os movimentos ciliares. A partir desse período, se inicia um processo fundamental para a metamorfose, envolvendo a reabsorção dos tecidos; verifica-se que os braços começam a diminuir gradativamente seu comprimento. No décimo nono dia (456 horas após a fecundação) já se observam estruturas se movendo, tendo a forma de pés ambulacrais; no entanto, os braços posteriores e os anteriores, ainda que menores, estão presentes (Fig. 26).

No vigésimo segundo dia (528 horas após a fecundação) os braços haviam sido reabsorvidos; no entanto, permanecia a estrutura oral, último órgão externo a desaparecer. O número de pés ambulacrâis aumentados, eram dificilmente observáveis, pois permaneciam sempre próximos ao corpo. O movimento da larva era realizado pelos cílios bem maiores e numerosos (Fig. 27). Desse estágio em diante as larvas respondiam de forma mais significativa à luz, expandido os pés ambulacrais quando expostos a pouca luminosidade e retraíndo-os, quando em presença da luz mais intensa.

Figuras: 26 Larva com 18 dias (432 horas) início da metamorfose. Poucos movimentos e pigmentos em grande quantidade (Objetiva 4x / ocular 15x). **27** Larva plúteus com 19 dias (456 horas). Presença de pés ambulacrais (Objetiva 4x / ocular 15x).



A metamorfose terminou no vigésimo terceiro dia e pôde-se observar as pós-larvas tendo as mesmas características que descreve Carpizo-Iltuarte et al. (2002), ou seja, forma arredondada, característica dos ouriços-do-mar juvenis, com seus espinhos e pés ambulacrais

claramente visíveis (Fig. 28, 29 e 30). Neste período a pós-larva de *E. lucunter* tem em média, aproximadamente, 432,25 m de diâmetro. Foram medidas seis pós-larvas apresentando um desvio padrão de 12,6. Os dados sobre o crescimento larval podem ser observados na Figura 31 e Tabela 2.

Figuras: 28 Larva com 22 dias (504 horas). Resquício dos braços orais e ausência dos outros pares de braços (Objetiva 10x / ocular 15x). 29 Ouriço-do-mar *E. lucunter* pós-larva com 23 dias (552 horas) de desenvolvimento. Fim da metamorfose. Diâmetro: 432,25 m (Objetiva 10x / ocular 15x). 30 Ouriço-do-mar *E. lucunter* pós-metamorfose com 23 dias, pés ambulacrários expandidos (Objetiva 4x / ocular 15x). 31 *E. lucunter* com 24 dias (576 horas) de desenvolvimento (Objetiva 10x / ocular 15x).

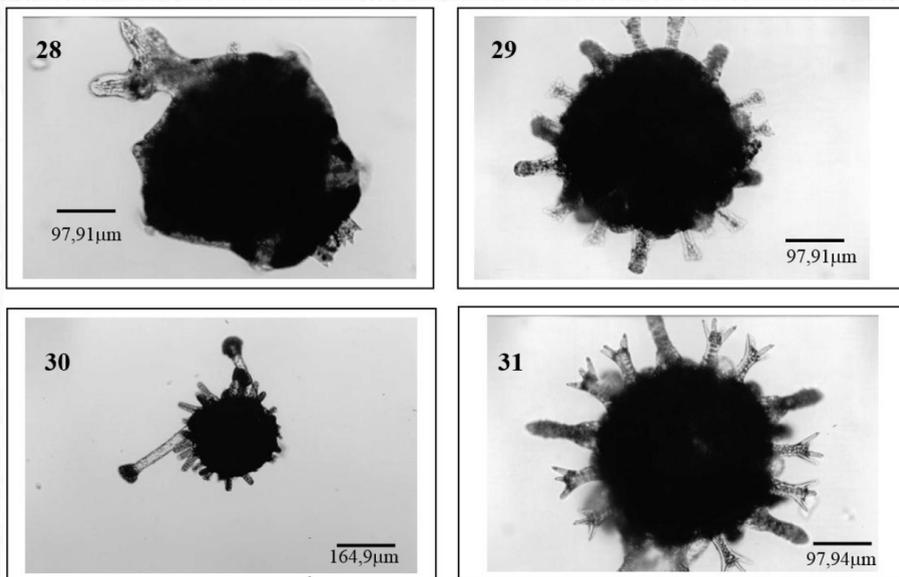


Fig. 33 – Comprimento do braço posterior das larvas de *E. lucunter* em 13 dias.

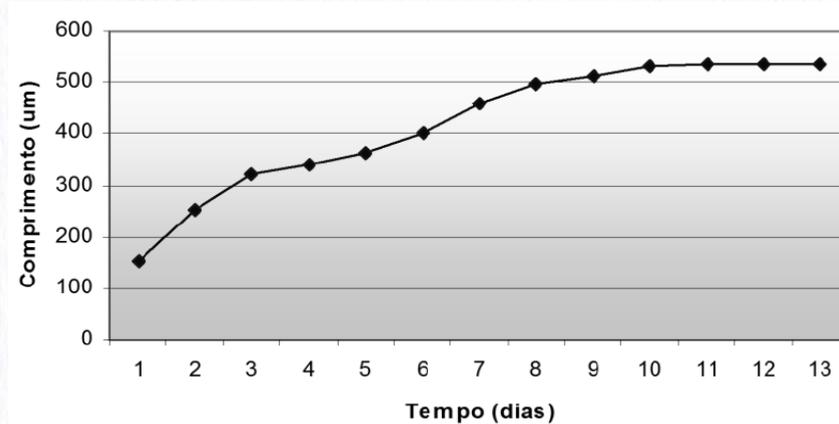


Tabela 2 – Crescimento do braço posterior das larvas plúteus em um período de 13 dias.

Tempo (dias)	Tempo (horas)	Média do comprimento (μm)	Desvio Padrão
1	24	152,46	12,2
2	48	250,50	15,2
3	72	320,04	18,5
4	96	341,46	19,4
5	120	363,30	26,0
6	144	402,36	27,1
7	168	457,06	31,1
8	192	498,54	32,7
9	216	510,52	37,4
10	240	530,46	37,5
11	264	535,08	36,2
12	288	535,02	36,2
13	312	536,70	37,4
14	336	-	-
15	360	-	-

- não foram medidos

As larvas de *Paracentrotus lividus* (RODRIGUES, 2002) permanecem no plâncton de 23 a 29 dias e, quando alcançam o tamanho aproximando de 0,4 mm, sofrem a metamorfose se transformando em juvenil, enquanto a larva do ouriço *Salmacis bicolor* sofre metamorfose em um período de 23 a 24 dias (AIAR, 1935). As larvas de *Strongylocentrotus franciscanus*, *S. purpuratus* e *Lytechinus pictus*, em laboratório, alcançaram a fase de pré-metamorfose em um período de 26, 21 e 22 dias, respectivamente (CARPIZO-ITUARTE et al, 2002). Segundo PEARCE; SCHEIBLING (1991), os ouriços-do-mar são induzidos à metamorfose com até 75 dias após fecundação, embora possam ser estimulados pela presença de algas.

Em ambiente natural a fase larval termina quando ocorre uma nova metamorfose e o organismo se fixa ao substrato. Esta metamorfose é induzida por fatores ambientais, que indicam a disponibilidade de um habitat bentônico adequado. Algumas espécies buscam a presença de outros indivíduos da mesma espécie, algas ou microorganismos para a “escolha” do lugar onde vão se fixar (McEDWARD; MINER, 2001). Segundo RODRIGUES (2002), as primeiras fases da metamorfose ocorrem rapidamente, através de uma série de trocas morfológicas que transformam a larva em um juvenil; todavia, mesmo que a reabsorção dos tecidos

larvais seja rápida, a formação do intestino funcional do juvenil é um processo lento; nesta fase o organismo se mantém através das reservas adquiridas na fase larval. O recrutamento termina com êxito quando os indivíduos conseguem superar os obstáculos de predação, enfermidades, competição, condições físico-química e a metamorfose se completa. O desenvolvimento pós-metamórfico inclui crescimento e maturação sexual até alcançar o estágio de adulto (McEDWARD; MINER, 2001).

Considerações finais

A presente pesquisa mostrou, pela primeira vez para o ouriço do mar, *E. lucunter*, a sequência de fases e seus respectivos tempos de duração, além da caracterização de cada uma destas fases, desenvolvidas sob condições ótimas de temperatura, salinidade, pH e oxigênio dissolvido, conforme determinadas em trabalho anterior.

As primeiras três clivagens ocorrem num período aproximado de 90, 120 e 150 minutos, respectivamente. O início da formação da larva plúteus, numa temperatura de 27°C, foi estimada em 24 horas; no entanto a mesma adquire uma forma mais completa (braços posteriores longos e anteriores desenvolvidos) em um período superior a 48 horas. Quando formados, os braços posteriores possuem um comprimento médio de 250 m (em um período de 48 horas, a uma temperatura de 27°C). A metamorfose se completou com 23 dias de desenvolvimento e a pós-larva apresentava um diâmetro médio de 432,25 m com um desvio-padrão de 12,6 m.

Os dados possibilitam uma acurada interpretação dos resultados obtidos em ensaios e enriquece o "pool" de informações existentes. No caso da *E. lucunter*, este estudo é o primeiro a abordar estes aspectos, de importância fundamental para a precisão dos testes de toxicidade baseados em respostas desta espécie à exposição de contaminantes.

Referências

- AIAR, R. G., Early development and metamorphosis of the tropical echinoid *Salmacis bicolor*, Agassiz. Proc. Inciam Acad. Sci. Sect. B, 1, 11, 1935, p. 714-728.
- BEIRAS, R.; VÁZQUEZ, E.; BELLAS, J.; LORENZO, J. I.; FERNÁNDEZ, N.; MACHO, G.; MARIÑO, J.C.; CASAS, L. Sea urchin embryo bioassay for in situ evaluation of the biological quality of coastal seawater. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, Univ. Of Vigo, Spain, 52, 2001. p. 29-32.
- BOLTON, T. F.; THOMAS, F.I. M. Physical forces experienced by echinoid eggs in the oviduct during spawning: comparison of the geminate pair *Echinometra vanbrunti* and *Echinometra lucunter*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 267. 2002. p. 123– 137
- CARPISO-ITUARTE, E.; SALAS-GARZA, A.; PARÉS-SIERRA, G. Induction of metamorphosis with KCl in three species of sea urchins and its implications in the production of juveniles. *Rev. Ciencias Marinas*, Vol. 28, Nº 2, 2002. P. 157 – 166.
- FRANSOZO, A.; FRANSOZO-NEGREIRO, M. L., *Zoologia dos Invertebrados*. 1ª ed. Rio de Janeiro. Ed. Roca. 2018, 1030p.
- GAGO, J. *Sea urchin Paracentrotus lividus (Lamarck 1816) eggs and endotrophic larvae: Potential of their use as marine larval fish first-feeding*. Tese (Doutorado em Biologia). Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Animal, 2009, 137p
- GÁRCIA, S. M. L.; FERNÁNDEZ, C. G. *Embriologia*. Editora Artmed, 2ª edição, 2003, 416p.
- KOBAYASHI, N.; OKAMURA, H. Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. Tracing the cause by the effects. *Elsevier Chemosphere*. Vol 55. 2004. pp. 1403- 1412.
- LEE, H.H.; XU, C.H. Effects of Metals on Sea Urchin Development: A Rapid Bioassay. *Marine Pollution Bulletin*. Vol. 15. nº 1. 1984. pp. 18-21.

LEVITAN, D. R. Optimal Egg Size in Marine Invertebrates: Theory and Phylogenetic Analysis of the Critical Relationship between Egg Size and Development Time in Echinoids. *American Naturalist* vol. 156, no. 2. 2000 p. 175-192.

MATSUMOTO, Y.; TETSUYA K.; ISHIKAWA. Timers in early development of sea urchin embryos. *Develop. Growth & Differ.* Vol. 30, 1998, p. 543-552.

McEDWARD, L. R.; MINER, B. G. Echinoid larval ecology. En *Edible sea urchins: biology and ecology*. Lawrence J. M. Ed. Holanda, 2001.

MELLO, R. A. *Embriologia Comparada e Humana*. Editora Atheneu. Rio de Janeiro, 1989, 290p.

MENDES, A. C.; ARAUJO, J.; SOARES, F.; POUÇÃO-FERREIRA, P. Produção de larvas e juvenis de ouriços-do-mar (*Paracentrotus lividus*) na estação piloto de piscicultura de Olhão (EPPO). *Relat. Cient. Téc. IPMA, Série digital nº20*, 2018, 22 p.

NASCIMENTO, I. A. . Biomarcadores de estresse ambiental: desenvolvimento de técnicas e aplicações (Elaboração de Projeto de pesquisa CNPq - Proc. 478200/01-3, 2002-2004). 2002.

NASCIMENTO, N. C. *Buscando a precisão em testes ecotoxicológicos com o ouriço-do-mar Echinometra lucunter (Echinodermata: Echinoidea): caracterização do desenvolvimento embriolarval, e avaliação da sensibilidade a parâmetros ambientais e de substâncias de referência*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia – Instituto de Biologia. 2005. 163p.

NEWPORT, J.; KIRSCHNER, M. A Major development transition in early *Xenopus* embryos. Control of the onset of transcription. *Cell*: 30:675-686. 1982.

PEARCE, C. M. & SCHEIBLING, R. E. *Effect of macroalgae, microbial films, and conspecifics on the induction of metamorphosis of the green sea urchin Strongylocentrotus droebachiensis (Müller)*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol. 147, 1991, p. 147-162.

PHILLIPS, B. M.; NICELY, P. A.; HUNT, J. W.; ANDERSON, B. S.; TJEERDEMA, R. S.; PALMER, S. E. PALMER, F. H.; PUCKETT, H. M. *Toxicity of Cadmium-Copper-Nickel-Zinc Mixtures to Larval Purple Sea Urchins (Strongylocentrotus purpuratus)*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 70, 2003. pp.592–599.

PRÓSPERI, V.A.; ARAÚJO, M.M.S.. Teste de toxicidade crônica com *Lytechinus variegatus*, Lamarck 1816 e *Echinometra lucunter*, Linnaeus 1758 (Echinodermata: Echinoidea). In *Métodos em Ecotoxicologia Marinha: Aplicações no Brasil* / Editado por Iracema Andrade Nascimento, Eduinetty Ceci P. M. Sousa, Nipper. São Paulo: Editora Artes Gráficas e Indústria Ltda. 2002. 262p. 2002.

QUINIOU, F.; GUILLOU, M.; JUDAS, A. Arrest and delay in embryonic development in sea urchin populations of the Bay of Brest (Brittany, France): Link and environmental factors. *Marine Pollution Bulletin* Vol. 38, nº5, 1998. pp. 401-406.

RODRIGUES, N. F. *Evaluación biológica de la contaminación marina costera mediante bioensayos con embriones del erizo de mar Paracentrotus lividus*. Tesis doctoral – Univer. del España. 2002. 211p.

RUPPERT, E.; BARNES, R. D. *Zoologia dos Invertebrados*. 7ª ed. São Paulo. Editora Rocca. 2005, 1035p

SATOH, N. Recent advances in our understanding of the temporal control of early embryonic development in amphibians. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 89: Suppl. 257-270. 1985.

_____; IKEGAMI, S. A definite number of aphidicolin-sensitive cell-cyclic events are required for acetylcholinesterase development in the presumptive muscle cells of ascidian embryos. *J. Embryol. Exp. Morph.*, 64: 61-71. 1981.

SOLL, D. R. A new method for examining the complexity and relationships of "timers" in developing systems. *Develop Biol.*, 95: 73-91. 1983.

TAVARES, L. H. S. & ROCHA O. *Produção de plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos*. Editora Rima, São Carlos, 2001. 106p.

THOMAS, F. I. M.; BOLTON, T. F.; SASTRY, A.M. Mechanical forces imposed on echinoid eggs during spawning: mitigation of forces by fibrous networks within egg extracellular layers. *The Journal of Experimental Biology* 2001 p.204, 815–821.

TYLER, A. & TYLER, B. S. The gametes; some procedures and properties. In *Physiology of Echinodermata*. Edited by Richard A. Boolootian. New York, John Wiley & Sons Inc. 1966. 822p.

TOMMASI, L.R. Lista dos equinóides recentes do Brasil. *Cont. inst. Oceanogr. Univ. São Paulo*, n. 11, 1966. p. 1-50.