

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 17/07/2025.

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)**

**EVOLUÇÃO DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO EM
CARANGUEJOS THORACOTREMATA: UMA ANÁLISE INTEGRADA DA
MORFOLOGIA E FILOGENIA MOLECULAR**

MARIA ALICE GARCIA BENTO

**Rio Claro – SP
2023**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)**

**EVOLUÇÃO DO SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO EM
CARANGUEJOS THORACOTREMATA: UMA ANÁLISE INTEGRADA DA
MORFOLOGIA E FILOGENIA MOLECULAR**

MARIA ALICE GARCIA BENTO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia)

Orientador: Dr. Fernando José Zara

Coorientador: Dra. Laura López Greco

B478e

Bento, Maria Alice Garcia

Evolução do sistema reprodutor masculino em caranguejos Thoracotremata:
uma análise integrada da morfologia e filogenia molecular / Maria Alice
Garcia Bento. -- Rio Claro, 2023

320 p. : il., tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de
Biotecnologia, Rio Claro

Orientador: Fernando José Zara

Coorientadora: Laura López Greco

1. Zoologia. 2. Morfologia celular. 3. Órgãos reprodutores. 4. Histologia. 5.
Ultraestrutura. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biotecnologia, Rio
Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EVOLUÇÃO DO SISTEMA REPRODUTOR EM CARANGUEJOS PINNOTHEROIDEA, GRAPSOIDEA E OCYPODOIDEA: ANÁLISE INTEGRATIVA PARA A COMPREENSÃO DAS ESTRATÉGIAS REPRODUTIVAS E RELAÇÕES DE PARENTESCO

AUTORA: MARIA ALICE GARCIA BENTO

ORIENTADOR: FERNANDO JOSÉ ZARA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências Biológicas (Zoologia), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO JOSÉ ZARA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Aplicada a Agropecuária / UNESP - FCAV Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 FERNANDO JOSE ZARA
Data: 17/07/2023 18:56:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. FELIPE BEZERRA RIBEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / Universidade de São Paulo

Documento assinado digitalmente
 FELIPE BEZERRA RIBEIRO
Data: 17/07/2023 18:48:43-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. LUCAS REZENDE PENIDO PASCHOAL (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / UNESP - FCAV Jaboticabal

Documento assinado digitalmente
 LUCAS REZENDE PENIDO PASCHOAL
Data: 17/07/2023 18:50:49-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. FERNANDO LUIS MEDINA MANTELATTO (Participação Virtual)
Departamento de Biologia / Universidade de São Paulo

FERNANDO LUIS
MEDINA
MANTELATTO:06772
214870
Assinado de forma digital por FERNANDO LUIS MEDINA MANTELATTO:06772214870
DN: c=BR, ou=ICP-Brasil, ou=Secretaria da Receita Federal do Brasil - RFB, ou=RFB e-CFF A3, ou=(EM BRANCO), ou=presencial, ou=1173323000192, ou=FERNANDO LUIS MEDINA MANTELATTO:06772214870
Data: 2023.07.17 18:58:40 -0300'

Profa. Dra. GISELE RODRIGUES TISEO (Participação Virtual)
Departamento de Zoologia / Universidade de São Paulo

Documento assinado digitalmente
 GISELE RODRIGUES TISEO
Data: 17/07/2023 20:16:20-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Rio Claro, 17 de julho de 2023

Título alterado para: "Evolução do sistema reprodutor masculino em caranguejos Thoracotremata: uma análise integrada da morfologia e filogenia molecular"

Dedico este trabalho primeiramente à Deus e a minha família, em especial a minha mãe, irmã e Gabriel que me acompanharam em todas as fases do Doutorado.

Agradecimentos

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – (CNPq) pela bolsa de Doutorado concedida (processo #40236/2019-8).

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro. Agradeço aos funcionários, membros do conselho e pela oportunidade de realizar o Doutorado, pelos auxílios, disciplinas e por tudo o que aprendi durante o período.

Agradeço à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias- FCAV/UNESP-Jaboticabal pela infraestrutura e todo o suporte.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro ao Laboratório de Morfologia de Invertebrados DBAA – FCAV, UNESP Jaboticabal (Biota #201050188-8, Biota Intercrusta #2018/13685-5 e JP 2005/04707-5). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. Agradeço ao auxílio referente a CAPES Ciências do Mar (CIMAR) II #1989/2014.

Agradeço ao meu orientador, Fernando José Zara, por todo o apoio e conhecimento adquirido nestes dez anos juntos. Obrigada pela paciência, ajuda, por compreender as minhas dificuldades e pelo estímulo que me deste para continuar lutando pela ciência. Serei sempre muito grata por todas as oportunidades e ajuda durante as etapas de dificuldades, que foram desde correções até auxílios financeiros. Obrigada por todas as oportunidades que tive no laboratório. Você é um cientista fenomenal!! Obrigada pela orientação e pela amizade, principalmente neste final de Doutorado.

À minha coorientadora Prof. Dra. Laura López Greco por todo auxílio, correções, paciência, amizade e ensinamentos durante estes anos de parceria.

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Pinheiro e toda a sua equipe por fornecer as espécies *Johngarthia* sp. e *Grapsus* sp. e pela colaboração no capítulo III.

Ao Prof. Dr. Fernando Mantelatto e a Jeniffer Teles pelo suporte e contribuição com a filogenia molecular proposta nesta tese.

Ao grande parceiro Djalma Rosa, vulgo “passarinho” pela indicação de parceiros para auxiliar nas coletas dos animais deste estudo.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Morfologia de Invertebrados - LMI: Abner (*in memoriam*), Bianca, Caio, Camila, Bárbara, Bárbara II, Fernanda,

Guilherme, Jean, Júlia, Leo Jaime (*in memorian*), Lucas, Maria Júlia, Suelen, Tavani e Timóteo, que compartilharam comigo muitos momentos felizes, tristes, de incertezas e de vitórias. Obrigada pelas correções, pelos conselhos, coletas e ajuda no processamento de amostras. Agradeço em especial a Marcinha, minha conselheira e amiga querida. Sem você tudo seria muito difícil e quase impossível. Obrigada por tudo. Camila Assugeni obrigada por tantos momentos compartilhados, amizade e suporte. Bárbara Paiva, você diz que não vale nada, mas como você vale muito. Obrigada por toda a ajuda, por não medir esforços em me ajudar a superar as dificuldades e por segurar a barra do final de Doutorado junto comigo. Você é uma menina de ouro, nunca duvide disso.

Agradeço a todos os professores e alunos de outras faculdades/ laboratórios que passaram pelo laboratório de Morfologia de Invertebrados.

Agradeço aos professores e funcionários do Departamento de Biologia Aplicada, em especial ao Prof. Dr. Davi Rossato, Marcia Macri, Aldo e Dona Lucinda. Macri, obrigada por ter me socorrido em muitas ocasiões, pelo suporte em tudo e pela amizade. Você é sensacional.

Ao laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV – Jaboticabal, em especial a técnica Cláudia Maria T. Fiorillo, pelo apoio, suporte, paciência e conversas durante as análises ultraestruturais dos espermatozoides. Muito obrigada!

Agradeço ao Ministério do Meio Ambiente e ao IBAMA pela licença SISBIO pela autorização das coletas e transporte dos animais (Fernando José Zara, licença permanente de coleta de material zoológico, MMA-SISBIO número 34587-1) e ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (Sisgen número A72C063).

Agradeço a todos os meus familiares, em especial à minha mãe Maria do Carmo, irmã Bia, meu pai Antonio e minha vó Maria. Mãe, obrigada por todo o suporte, ajuda, paciência, companheirismo durante todos esses anos. Sem você isso tudo seria impossível. Te amo muito.

Ao meu amor Gabriel, por todo o apoio e companheirismo de sempre. Obrigada por me ouvir e ter paciência durante os meus dias ruins e por ter vibrado com todas as minhas vitórias. Obrigada por me colocar para cima e por constantemente tentar me convencer de que eu sou capaz. Te amo muito e você é a minha melhor escolha.

Aos meus amigos da vida e que Deus me presenteou. Muito obrigada!

Resumo

Em caranguejos, o sistema reprodutor masculino e as glândulas acessórias são associadas à produção de fluido seminal, podendo apresentar diferentes morfologias e funções, dependendo das estratégias das famílias, incluindo a competição pela fertilização dos ovócitos. Contudo, nos caranguejos verdadeiros pertencentes à Thoracotremata, a morfologia e o papel morfofisiológico do sistema reprodutor masculino e suas glândulas no armazenamento do ejaculado ainda é pouco conhecido. Além disso, poucos trabalhos relacionam a ultraestrutura dos espermatozoides e filogenia com base em dados moleculares para elucidar ou discutir relações filogenéticas do grupo. Desta maneira, o objetivo geral desta tese foi buscar padrões morfológicos relacionados ao sistema reprodutor masculino para entender a evolução do modelo de armazenamento espermático e ultraestrutura dos espermatozoides em Pinnotheroidea, Grapsoidea e Ocypodoidea. Para tal, foi realizada a descrição anatômica, histológica e histoquímica do sistema reprodutor masculino, com ênfase no padrão de produção de fluido seminal e armazenamento dos espermatozoides. Adicionalmente, foi realizada a descrição ultraestrutural dos espermatozoides e a análise filogenética por máxima verossimilhança, utilizando sequências obtidas do Genbank, para a reconstrução dos estados de caracteres ancestrais. Em todos os representantes analisados, o sistema reprodutor masculino é um órgão bilateral em forma de "H", composto por um par de testículos e um par de vasa deferentia. As glândulas acessórias se abrem na região de transição entre as regiões média e posterior do vaso deferente, e produzem uma quantidade significativa de fluido seminal, o qual pode desempenhar um papel importante na lubrificação dos espermatóforos durante a transferência dos espermatozoides. Em termos ultraestruturais, os espermatozoides apresentam algumas plesiomorfias, incluindo o opérculo perfurado, botão apical, anel opercular acessório, aba periopercular, anel espessado eletrodenso e a ausência do anel xantídeo modificado. Além disso, observou-se que as famílias de Thoracotremata estudadas podem apresentar características distintivas, que podem ser compartilhadas de forma convergente com outras famílias não intimamente relacionadas. As análises morfo-ultraestruturais desta tese permitiram a compreensão e preenchimento das lacunas previamente existentes nas relações de parentesco entre as famílias de Thoracotremata.

Palavras-chave: Armazenamento espermático, Eubrachyura, filogenia, microscopia eletrônica de transmissão.

Abstract

In crabs, the male reproductive system and accessory glands are associated with the production of seminal fluid and may exhibit different morphologies and functions depending on the reproductive strategies of the families, including competition for fertilizing the oocytes. However, in true crabs belonging to the Thoracotremata, the morphology and morphophysiological role of the male reproductive system and its glands in ejaculate storage are still poorly understood. Furthermore, few studies have included spermatozoa ultrastructure and phylogeny based on molecular data for elucidate or discuss the phylogenetic relationships within the group. Thus, the overall objective of this thesis was to investigate morphological patterns related to the male reproductive system for understand the evolution of spermatozoa storage models and spermatozoa ultrastructure in Pinnotheroidea, Grapsoidea, and Ocypodoidea. For that, an anatomical, histological, and histochemical description of the male reproductive system was conducted, with an emphasis on the pattern of seminal fluid production and spermatozoa storage. Additionally, an ultrastructural description of the spermatozoa and phylogenetic analysis by maximum likelihood, using sequences obtained from Genbank, were performed to reconstruct ancestral character states. In all analyzed representatives, the male reproductive system is a bilateral organ in the shape of an "H," composed of a pair of testes and a pair of vasa deferentia. The accessory glands open in the transition region between the middle and posterior regions of the vas deferens and produce a significant amount of seminal fluid, which may play an important role in lubricating spermatophores during sperm transfer. In the ultrastructure, the spermatozoa exhibit some plesiomorphies, including the perforated operculum, apical button, accessory opercular ring, rim periopercular, electron-dense thickened ring, and the absence of the modified xanthid ring. Furthermore, it was observed that the studied Thoracotremata families may possess distinctive characteristics that can be convergently shared with other unrelated families. The morpho-ultrastructural analyses in this thesis have allowed for the understanding and filling of previously existing gaps in the relationships between Thoracotremata families.

Keywords: Sperm storage, Eubrachyura, fertilization, phylogeny, transmission electron microscopy.

Sumário

Introdução geral.....	10
Capítulo I.....	22
A anatomia, histologia e histoquímica como ferramenta para contar a história evolutiva do sistema reprodutor masculino em caranguejos Thoracotremata.....	22
Resumo.....	23
Introdução.....	24
Material e Métodos	28
Resultados.....	31
Tabela, figuras e legendas.....	46
Discussão.....	76
Referências bibliográficas.....	84
Material suplementar.....	92
Capítulo II.....	97
Caracteres ultraestruturais e a evolução dos espermatozoides nos caranguejos Pinnotheridae e Ocypodidae (Thoracotremata).....	97
Resumo.....	98
Introdução.....	99
Material e Métodos.....	101
Resultados.....	102
Tabela, figuras e legendas.....	108
Discussão.....	130
Referências bibliográficas.....	136
Capítulo III.....	141
Ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides de <i>Johngarthia lagostoma</i> (H. Milne Edwards, 1837): qual o padrão morfológico para os Gecarcinidae descritos?.....	141
Resumo.....	142
Introdução.....	144
Material e Métodos.....	145
Resultados.....	146
Figuras, tabela e legendas.....	150
Discussão.....	157
Referências bibliográficas.....	162
Capítulo IV.....	167
Ultraestrutura dos espermatozoides em Grapsoidea (Thoracotremata): famílias Sesarmidae e Plagusiiidae.....	167
Resumo.....	168
Introdução.....	169
Material e Métodos.....	170
Resultados.....	172

Tabela, figuras e legendas.....	178
Discussão.....	202
Referências bibliográficas.....	207
Capítulo V.....	211
Espermiotaxonomia e filogenia molecular: análise integrativa para o estudo dos caracteres espermáticos em Varunidae e Grapsidae (Brachyura:	
Thoracotremata).....	211
Resumo.....	212
Introdução.....	113
Material e Métodos.....	214
Resultados.....	216
Tabela, figuras e legendas.....	225
Discussão.....	257
Referências bibliográficas.....	262
Capítulo VI.....	266
Ultraestrutura e filogenia molecular: história evolutiva dos espermatozoides em Thoracotremata (Decapoda: Brachyura).....	
Resumo.....	267
Introdução.....	268
Material e Métodos.....	271
Resultados.....	272
Tabela, figuras e legendas.....	277
Discussão.....	308
Referências bibliográficas.....	314
Considerações finais.....	320

Introdução geral

▪ Apresentação do grupo de estudo

A infraordem Brachyura Latreille, 1802 é um dos grupos mais diversos de crustáceos, compreendendo aproximadamente 7760 espécies de caranguejos que habitam ambientes marinhos, de água doce e terrestres (WoRMS, 2023). Além de sua diversidade, esse grupo desempenha um papel fundamental em vários níveis ecológicos e tem sido objeto de exploração humana tanto para alimentação quanto para a aquariorfilia (Guinot et al., 2013; Wolfe et al., 2019).

Com base na posição das aberturas genitais ou gonóporos de machos e fêmeas, os braquiúros foram classificados em três grandes grupos: Podotremata, Heterotremata e Thoracotremata (Guinot, 1977). A seção Podotremata reúne espécies em que os gonóporos abrem-se nas coxas do quinto e terceiro par de pereópodos em machos e fêmeas, respectivamente. Além disso, as fêmeas dessa seção possuem espermatecas, as quais são estruturas pares, separadas do ovário e oviduto que se formam a partir dos esternitos 7 e 8 e servem para o armazenamento de espermatozoides (Hartnoll, 1968; Guinot & Quenette, 2005; Garcia Bento et al., 2019). As subseções Heterotremata e Thoracotremata compartilham uma série de apomorfias, que incluem o oviduto com ligação aos receptáculos seminais (local onde os espermatozoides são armazenados nas fêmeas), que se abrem para o externo via vagina e vulva (Guinot, 1977; Guinot *et al.*, 2013). Os machos de Heterotremata têm seus gonóporos localizados nas coxas do quinto par de pereópodos, enquanto em Thoracotremata eles estão localizados no oitavo esternito. Nas fêmeas de ambas as subseções, as aberturas genitais (gonóporos) são encontradas no sexto esternito (Guinot, 1977). Os Heterotremata e Thoracotremata são considerados “caranguejos verdadeiros” e estão incluídos em Eubrachyura Saint Laurent, 1980 (Tsang *et al.*, 2014).

A subseção Thoracotremata agrupa caranguejos com uma ampla variedade estrutural (bauplan), fisiológica, comportamental e de importância para a dinâmica do ecossistema em que habitam (Guinot *al.*, 2013; López Greco, 2013; Tsang *et al.*, 2014). A posição filogenética de suas superfamílias tem se mostrado bastante divergente entre as abordagens morfológicas e moleculares. Guinot (1977), baseada em dados morfológicos, como o aumento do esterno torácico e posição dos

gonóporos, sistematizou Thoracotremata em quatro superfamílias monofiléticas: Cryptochiroidea Paulson, 1875, Grapsoidea MacLeay 1838, Ocyphodoidea Rafinesque, 1815 e Pinnotheroidea De Haan 1833. Em adição, embora alguns caracteres não tenham sido observados em todos os representantes das superfamílias e muitas espécies ainda não tenham sido estudadas quanto a esse aspecto, a monofilia de Thoracotremata tem sido sustentada pela ultraestrutura dos espermatozoides (Jamieson, 1991; Jamieson, 1994; Jamieson *et al.*, 1995; Jamieson & Tudge, 2000). De acordo com os autores, o grupo em questão apresenta as seguintes sinapomorfias: lamelação concêntrica na zona acrossomal externa, presença do botão apical na região perfurada do opérculo, ausência da zona acrossomal raiada e a diferenciação do material acrossomal, a qual parece ser uma extensão do “anel Xanthidae” (para revisão ver Davie *et al.*, 2015).

Contudo, estudos moleculares propuseram a não monofilia de Ocyphodoidea e Grapsoidea, evidenciando uma tendência a polifilia (Kitaura *et al.*, 2002; Schubart *et al.*, 2006; Tsang *et al.*, 2014, 2022; Wolfe *et al.*, 2022), como por exemplo os representantes de Ocyphodoidea (incluídos nas famílias Mictyridae Dana, 1951 e Macrophthalmidae Dana, 1851) e Grapsoidea (de Varunidae H. Milne Edwards, 1853) formando um clado com elevado suporte filogenético (Tsang *et al.*, 2014). Apesar do baixo suporte, Tsang *et al.* (2018) apontou provável polifiletismo de Pinnotheroidea, algo que havia sido abordado por Palacios Theil *et al.* (2016). Segundo os autores, alguns representantes de Pinnotheroidea (previamente classificados em Pinnotheridae de Haan, 1833), deveriam ser transferidos para Grapsoidea e incluídos na família Varunidae. Assim, a inter-relação entre as superfamílias ainda é controversa, havendo a necessidade de novos estudos relacionados à filogenia com a inclusão de novas espécies para auxiliar na resolução de problemas filogenéticos, principalmente para contribuir com o entendimento das relações de parentesco entre espécies pertencentes aos dois maiores clados de Thoracotremata: Grapsoidea e Ocyphodoidea.

Em geral, os Pinnotheroidea são caranguejos de pequeno porte, encontrados em ambientes marinhos e estuarinos, em simbiose com moluscos, habitando tubos de poliquetos, ou associados a equinodermos, dentre outros invertebrados (Harrison, 2004; Castro, 2015). Por sua vez, os representantes de Grapsoidea e Ocyphodoidea são de vida livre e representam a transição entre os ambientes marinhos e terrestres (Eliss, 1968; Watson-Zink, 2021; Wolfe *et al.*, 2022). Os grapsoídeos são

caranguejos semi-terrestres adaptados a diferentes ambientes com água salgada, salobra e doce, sendo que alguns representantes são encontrados em praias rochosas e arenosas, enquanto outros se abrigam na lama ou sobre raízes e troncos em regiões estuarinas, apicuns e manguezais (Melo, 1996; Pinheiro et al., 2016; Santos et al., 2022). Os Ocypodoidea são encontrados em estuários de regiões tropicais e subtropicais, sendo algumas espécies endêmicas de áreas de manguezal. Por habitarem ambientes úmidos e vegetados como em ilhas oceânicas e semi-terrestres, como a transição Mata Atlântica e restinga, estes caranguejos desenvolveram adaptações fisiológicas e comportamentais, principalmente relacionadas à reprodução, para garantir a sobrevivência nestes ambientes (para revisão ver Eliss, 1968; Pinheiro *et al.*, 2016; Watson- Zink, 2021).

▪ Sistema reprodutor e fluido seminal

Os estudos do sistema reprodutor em Pinnotheroidea, Grapsoidea e Ocypodoidea são incipientes, tendo em vista a sua biodiversidade, com os principais trabalhos envolvendo o sistema reprodutor masculino, a destacar *Goniopsis cruentata* (Latreille, 1803), *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), *Armases rubripes* (Rathbun, 1897), *Aratus pisonii* (H. Milne Edwards, 1837), *Cardisoma guanhumii* Latreille in Latreille, Le Peletier, Serville & Guérin, 1828), *Pinnotheres pisum* (Linnaeus, 1767) e *Nepinnotheres pinnotheres* (Linnaeus, 1758) e *Pachygrapsus transversus* (Gibbes, 1850) e *P. gracilis* (de Saussure, 1857) (Garcia & Silva, 2006; Castilho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009; Nicolau *et al.*, 2012; Shinozaki-Mendes et al., 2012; Becker *et al.*, 2013; Tiseo *et al.*, 2014). Em Brachyura, o sistema reprodutor masculino é um órgão bilateral, formado por um par de testículos, localizado em ambas às margens superiores do cefalotórax, os quais são contínuos ao par de vaso deferente, que se estende longitudinalmente sobre o hepatopâncreas, abaixo do coração, terminando na região posterior do corpo nas aberturas genitais (Krol *et al.*, 1992; López Greco, 2013, McLay & Becker, 2015). Comumente, o testículo exibe anatomia em forma de “H” ou “V” para a maioria dos caranguejos (Krol *et al.*, 1992; Garcia & Silva, 2006; Castilho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009; Tiseo *et al.*, 2014), sendo a anatomia para alguns representantes de água doce em forma de “U” invertido, como em Trichodactylidae H. Milne Edwards, 1853 (De Oliveira & Zara, 2018).

A formação dos espermatozoides (espermatogênese e espermiogênese) pode ocorrer de forma distinta entre as espécies, levando os testículos a serem classificados histologicamente como do tipo tubular ou lobular (Nagao & Munehara, 2003). O testículo tubular foi descrito para os dromiídeos da seção Podotremata, sendo também típico em Majoidea Samouelle, 1819, Xanthoidea MacLeay, 1838 (Heterotremata) e Grapsoidea, já o lobular é comum a todos os outros braquiúros (Simeó *et al.*, 2009; Nicolau *et al.*, 2012; Tiseo *et al.*, 2014; Garcia Bento *et al.*, 2019).

Os espermatozoides maduros são encaminhados aos vasa deferentia, os quais podem ou não serem divididos em diferentes regiões variando de 3-10, segundo as descrições dos autores (Krol *et al.*, 1992; Garcia & Silva, 2006; Castilho *et al.*, 2008; Tiseo *et al.*, 2014). Em Dromiidae De Haan, 1833, o vaso deferente é um tubo único e bastante convoluto, e não apresenta diferentes regiões anatômicas e histológicas (Garcia Bento *et al.*, 2019). Em todos os demais Brachyura, o vaso deferente é comumente dividido em três regiões: vaso deferente anterior (AVD), médio (MVD) e posterior (PVD), como padronizado por Tiseo *et al.* (2014). Porém, em Ocypodoidea, como em *U. cordatus*, estas mesmas regiões foram classificadas como região proximal, medial e distal e o vaso deferente em *G. cruentata* foi formado por apenas duas regiões, denominadas expansões e vaso deferente posterior (Krol *et al.*, 1992; Garcia & Silva, 2006; Castilho *et al.*, 2008; Santos *et al.*, 2009; Nicolau *et al.*, 2012). A AVD é responsável pela formação dos espermatóforos e, de acordo com os diferentes tipos de secreções produzidas e sua funcionalidade, pode ser dividida em diferentes porções, sendo mais comum em duas, a porção proximal (AVDp) e a porção distal (AVDd) (Zara *et al.*, 2012; Tiseo *et al.*, 2014; Antunes *et al.*, 2018). A AVDp ligada ao ducto seminífero, tem como função receber e armazenar massas de espermatozoides imersos em fluido seminal, enquanto que a AVDd é encontrada próxima à MVD, sendo que nesta região uma parte da secreção produzida passa a envolver os espermatozoides, formando a parede dos espermatóforos (Zara *et al.*, 2012; Tiseo *et al.*, 2014; Antunes *et al.*, 2018). Tais espermatóforos podem ser coenospérmicos, agrupando vários espermatozoides por espermatóforo, sendo o padrão típico registrado para a maioria dos caranguejos (El-sherief, 1991; Jamieson, 1994; Anilkumar, 1999). Porém, em algumas espécies de água doce e ao menos uma espécie eurialina como o grapsóideo *P. gracilis*, cada espermatóforo apresenta apenas um espermatozoide (Guinot, 1997; Klaus *et al.*,

2009; Tiseo *et al.*, 2014, 2017). Assim, devido à grande biodiversidade de representantes em Brachyura e os diferentes padrões de descrições estabelecidos na literatura científica, ainda não é possível determinar se a formação dos espermatóforos obedece um claro padrão filogenético ou se estão relacionados com o processo de deiscência, principalmente em relação às espécies terrestres e semi-terrestres.

A MVD e a PVD armazenam os espermatóforos e produzem grande parte do fluido seminal (Zara *et al.*, 2012; Tiseo *et al.*, 2014). Uma parte do fluido seminal é proveniente das glândulas acessórias associadas ao vaso deferente, as quais recebem distintos nomes na literatura e podem variar quanto à localização, morfologia e função (Simeó *et al.*, 2009, Zara *et al.*, 2012; Antunes *et al.*, 2018). Quando associadas à MVD ou inseridas na região de transição entre a MVD e PVD, estas foram classificadas como “cecos”, “divertículos” ou “expansões laterais”, atuando principalmente na formação de estratos ou pacotes espermáticos como em Majoidea ou plug espermático em Portunoidea Rafinesque, 1815 (Diesel 1989; Zara *et al.*, 2012, 2014; Antunes *et al.*, 2018). Por sua vez, tais glândulas podem ocorrer concomitantemente na MVD e PVD, sendo denominadas como “expansões laterais”, “apêndices tubulares”, “evaginações” ou “cecos”, ou podem ocorrer exclusivamente na PVD, como em Pinnotheroidea, Grapsoidea e alguns Ocypodoidea ou podem estar ausentes como em Podotremata (Garcia & Silva, 2006; Castilho *et al.*, 2008; Simeó *et al.*, 2009; Garcia Bento *et al.*, 2019). Apesar de serem descritas, a função destas glândulas nos representantes de Grapsoidea e Ocypodoidea foram pouco ou nada discutidas, sendo que somente em *Pachygrapsus* Randall, 1840 é proposto que estas podem influenciar no padrão de armazenamento e deiscência dos espermatóforos (Tiseo *et al.*, 2014, 2017) ou em *Pi. pisum* e *N. pinnotheres*, onde a secreção parece lubrificar os espermatóforos para a transferência espermática (Becker *et al.*, 2013). Adicionalmente, em Thoracotremata, não existe informação sobre a função destas glândulas na formação de plug ou pacotes espermáticos como observados em Majoidea e Portunoidea, ou discussões mais aprofundadas que abordem algo sobre a mistura dos fluidos seminais produzidos pelas glândulas durante o armazenamento, algo que foi brevemente discutido para Pinnotheridae e nos Ocypodidae *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) e *U. cordatus* (Sant’Anna *et al.*, 2007; López Greco *et al.*, 2009; Becker *et al.*, 2011). Outro ponto pouco explorado é a organização anatomo-

histológica destas glândulas, as quais parecem ter arranjos morfológicos e aberturas distintas entre as diferentes famílias (Garcia Bento & Zara, informação pessoal), não estando claro se estas morfologias possam ser consideradas um sinal filogenético.

▪ **Ultraestrutura dos espermatozoides**

Em caranguejos, os espermatozoides são imóveis e aflagelados, mostrando-se relativamente complexos quando analisados ultraestruturalmente, por apresentarem vesícula acrossomal esférica constituída por diferentes zonas ou camadas, comumente conhecidas por zona acrossomal interna, zona acrossomal externa, zona acrossomal raiada e zona acrossomal eletrólucida (Jamieson, 1994; Jamieson *et al.*, 1995; Jamieson & Tudge, 2000). Além disso, os espermatozoides contam com a câmara perforatorial, opérculo e núcleo geralmente formado por cromatina fibrosa, com ou sem braços radiais. A maioria dos Thoracotremata compartilham os seguintes caracteres: zonação concêntrica do conteúdo acrossomal, ausência da zona acrossomal raiada, botão apical preenchendo a perfuração central da câmara perforatorial e anel opercular acessório (Jamieson & Tudge, 2000). Porém, entre as superfamílias alguns destes caracteres não são encontrados em alguns representantes, como por exemplo, o botão apical no Ocyphodoidea *Uca thayeri* Rathbun, 1900 (Benetti *et al.*, 2008), o qual pode ser considerada uma apomorfia da espécie ocasionado pela perda deste carácter basal em Thoracotremata (Jamieson *et al.*, 1995).

Pela complexidade e diferenças dos caracteres entre os grupos, a ultraestrutura dos espermatozoides tem se mostrado eficiente na resolução de questões taxonômicas envolvendo relações filogenéticas entre crustáceos decápodes (Jamieson 1991, 1994; Tudge, 2009), sendo que algumas propostas filogenéticas foram baseadas apenas na morfologia ultraestrutural dos espermatozoides (Jamieson *et al.*, 1994; Jamieson & Tudge, 2000; Tudge, 2009; Klaus *et al.*, 2009). Entretanto, estudos recentes mostraram que importantes avanços na sistemática filogenética podem ser obtidos por meio das análises da ultraestrutura dos espermatozoides integrados a dados moleculares (Camargo *et al.*, 2016, 2017; Assugeni *et al.*, 2017; Garcia Bento *et al.*, 2018). A ultraestrutura dos espermatozoides associados à filogenia molecular de representantes de camarões da família Sicyoniidae Ortmann, 1898 e tribos de Penaeidae (Rafinesque, 1815) foi descrita por Camargo *et al.* (2016,

2017). Enquanto, Garcia Bento *et al.* (2018), descreveram a ultraestrutura dos espermatozoides, adicionando dados moleculares de espécies primitivas (Podotremata) pouco abordadas na literatura, encontrando caracteres espermáticos consistentes que corroboram com a sistemática filogenética dos táxons. Por sua vez, Assugeni *et al.* (2017), utilizaram as duas ferramentas para elucidar relações de parentesco entre representantes de Heterotremata da família Mithracidae MacLeay, 1838. Em relação aos Thoracotremata, algumas espécies tiveram os espermatozoides descritos sob o ponto de vista ultraestrutural (para revisão ver Jamieson & Tudge, 2000). Contudo, não existem trabalhos que associem estes caracteres a dados moleculares para elucidar as relações filogenéticas entre os táxons. Além disso, caracteres do sistema reprodutor masculino e feminino podem ser adicionados aos caracteres espermáticos a fim de preencher lacunas presentes em vários pontos da árvore evolutiva dos grupos.

Na presente tese de doutoramento são descritas a anatomia, histologia, histoquímica e ultraestrutura dos espermatozoides do sistema reprodutor masculino em representantes das superfamílias Grapsoidea, Ocypodoidea e Pinnotheroidea. O primeiro capítulo trata da descrição anatômica, histológica e histoquímica do sistema reprodutor destes grupos. O segundo capítulo refere-se a ultraestrutura dos espermatozoides de Pinnotheridae e Ocypodidae e a reconstrução ancestral para estas famílias. O terceiro capítulo descreve os espermatóforos e espermatozoides dos Gecarcinidae brasileiros, enquanto o quarto capítulo aborda a ultraestrutura dos espermatozoides de Sesarmidae e Plagusiidae em um contexto filogenético. O quinto capítulo apresenta a ultraestrutura dos espermatozoides de Varunidae e Grapsidae e o sexto capítulo aborda a história evolutiva dos espermatozoides em Thoracotremata. A hipótese a ser testada prevê que os caracteres do sistema reprodutor e espermáticos sejam semelhantes entre representantes da mesma família.

Referências bibliográficas

- Anilkumar, G., Sudha, K., & Subramoniam, T. (1999). Spermatophore transfer and sperm structure in the brachyuran crab *Metopograpsus messor* (Decapoda: Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology*, *19*, 361-370.
<https://doi.org/10.1163/193724099X00178>
- Antunes, M., Zara, F. J., López Greco, L. S., & Negreiros-Fransozo, M. L. (2018). Male reproductive system of the arrow crab *Stenorhynchus seticornis* (Inachoididae). *Invertebrate Biology*, *137*, 171-184. <https://doi.org/10.1111/ivb.12214>
- Assugeni, C. D. O., Magalhães, T., Bolaños, J. A., Tudge, C. C., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2017). Ultrastructure of spermatozoa of spider crabs, family Mithracidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura): Integrative analyses based on morphological and molecular data. *Journal of Morphology*, *278*, 1628-1646. <https://doi:10.1002/jmor.20737>
- Becker, C., Brandis, D., & Storch, V. (2011). Morphology of the female reproductive system of European pea crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Pinnotheridae). *Journal of Morphology*, *272*, 12-26. <https://doi.org/10.1002/jmor.10884>
- Becker, C., Klaus, S., & Tudge, C. C. (2013). Male internal reproductive structures of European pea crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Pinnotheridae): Vas deferens morphology and spermatozoal ultrastructure. *Journal of Morphology*, *274*, 1312-1322. <https://doi.org/10.1002/jmor.20184>
- Benetti, A. S., Santos, D. C., Negreiros-Fransozo, M. L., & Scelzo, M. A. (2008). Spermatozoal ultrastructure in three species of the genus *Uca* Leach, 1814 (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Micron*, *39*(3), 337-343. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.04.004>
- Beninger, P. G., Elner, R. W., Foyle, T. P., & Odense, P. H. (1988). Functional anatomy of the male reproductive system and the female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. *Journal of Crustacean Biology*, *8*(3), 322-332. <https://doi.org/10.1163/193724088X00198>
- Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2016). Integrative analysis of sperm ultrastructure and molecular genetics supports the phylogenetic positioning of the sympatric rock shrimps *Sicyonia dorsalis* and *Sicyonia typica* (Decapoda, Sicyoniidae). *Zoomorphology*, *135*, 67-81. <https://doi.org/10.1007/s00435-015-0287-2>
- Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2017). Sperm ultrastructure of shrimps from the family Penaeidae (Crustacea: Dendrobranchiata) in a phylogenetic context. *Arthropod structure & development*, *46*(4), 588-600. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2017.01.006>
- Castilho, G. G., Ostrensky, A., Pie, M. R., & Boeger, W. A. (2008). Morphology and histology of the male reproductive system of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (L.) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Acta Zoologica*, *89*(2), 157-161. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2007.00304.x>
- Castro, P., Davie, P., Guinot, D., Schram, F., & von Vaupel Klein, C. (Eds.). (2015). *Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea, Volume 9 Part C (2 Vols): Brachyura*. Brill.
- Davie, P. J., Guinot, D., & Ng, P. K. (2015). Phylogeny of Brachyura. In *Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea, Volume 9 Part C (2 vols)* (pp. 921-979). Brill.
- De Grave, S., Pentcheff, N. D. S., Ahyong, T., Chan, T., Crandall, K. A., Dworschak, P. C., Felder, D. L., Feldmann, R. M., Fransen, C. H. J. M., Goulding, L. Y. D., Lemaitre, R., Low, M. E. Y., Martin, J. W., Ng, P. K. L., Schweitzer, C. E., Tan,

- S. H., Tshudy, D., & Wetzer, R. A. (2009). Classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. *Raffles Bulletin of Zoology*, *21*, 1–109.
- De Oliveira, L. J. F., & Zara, F. J. (2018). An investigation into the male reproductive system of two freshwater crabs from the Amazon: Is there a sperm plug or packet formation? *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*, *51*(4), 227-249. <https://doi.org/10.1080/10236244.2018.1523678>
- Diesel, R. (1989). Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus phalangium* (Decapoda: Majidae): observations on sperm transfer, sperm storage, and spawning. *Journal of Crustacean Biology*, *9*(2), 266-277.
- Ellis, D. E. (1968). Transition from water to land in decapod crustaceans. *American Zoologist*, *8*(3), 355-392. <https://doi.org/10.1093/icb/8.3.355>
- El-Sherief, S. S. (1991). Fine structure of the sperm and spermatophores of *Portunus pelagicus* (L.) (Decapoda, Brachyura). *Crustaceana*, *61*(3), 271-279.
- Garcia Bento, M. A., Lopez Greco, L. S., & Zara, F. J. (2019). Seminal fluid production and sperm packaging in dromiid crabs (Brachyura, Podotremata). *Zoology*, *132*, 17-30. <https://doi.org/10.1016/j.zool.2018.09.001>
- Garcia Bento, M. A., Miranda, I., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2018). Comparative spermatozoal ultrastructure and molecular analysis in dromiid crabs and their phylogenetic implications for Dromiidae and Podotremata (Decapoda: Brachyura). *Arthropod Structure & Development*, *47*(6), 627-642. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2018.10.001>
- Garcia, T. M., & Silva, J. R. F. (2006). Testis and vas deferens morphology of the red-clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata*) (Latreille, 1803). *Brazilian Archives of Biology & Technology*, *49*, 339-345. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000300019>
- Guinot, D. (1977). Propositions pour une nouvelle classification des Crustacés Décapodes Brachyours. *Comptes rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, *285*, 1049-1052.
- Guinot, D., & Quenette, G. (2005). The spermatheca in Podotreme crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Podotremata) and its phylogenetic implication. *Zoosystema*, *27*(2), 267-342.
- Guinot, D., Tavares, M., & Castro, P. (2013). Significance of the sexual openings and supplementary structures on the phylogeny of brachyuran crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura), with new nomina for higher-ranked podotreme taxa. *Zootaxa*, *3665*(1), 1-414. DOI: 10.11646/ZOOTAXA.3665.1.1
- Harrison, J. S. (2004). Evolution, biogeography, and the utility of mitochondrial 16s and COI genes in phylogenetic analysis of the crab genus *Austinixa* (Decapoda: Pinnotheridae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *30*(3), 743-754. [https://doi.org/10.1016/S1055-7903\(03\)00250-1](https://doi.org/10.1016/S1055-7903(03)00250-1)
- Hartnoll, R. G. (1968). Morphology of the genital ducts in female crabs. *Journal of the Linnean Society of London, Zoology*, *47*(312), 279-300.
- Jamieson, B. G. M. (1991). Ultrastructure and phylogeny of crustacean spermatozoa. *Memoirs of the Queensland Museum*, *31*, 109–142.
- Jamieson, B. G. M. (1994). Phylogeny of the Brachyura with Particular Reference to the Podotremata: Evidence from a Review of Spermatozoal Ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, *345*(1314), 373-393. <https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0116>
- Jamieson, B. G., Guinot, D., & Richer de Forges, B. (1995). Phylogeny of the Brachyura (Crustacea, Decapoda): evidence from spermatozoal ultrastructure. *Advances in spermatozoal phylogeny and taxonomy*, *166*, 265-283.

- Jamieson, B. G. M., & Tudge, C. C. (2000). Crustacea-Decapoda. In B. G. M. Jamieson (Ed.), *Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny* (pp. 1-95).
- Kitaura, J., Wada, K., & Nishida, M. (2002). Molecular phylogeny of grapsoid and ocy podoid crabs with special reference to the genera *Metaplastax* and *Macrophthalmus*. *Journal of Crustacean Biology*, 22(3), 682-693. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990281>
- Klaus, S., Schubart, C. D., & Brandis, D. (2009). Ultrastructure of spermatozoa and spermatophores of old world freshwater crabs (Brachyura: Potamoidea: Gecarcinucidae, Potamidae, and Potamonautidae). *Journal of Morphology*, 270(2), 175-193. <https://doi.org/10.1002/jmor.10678>
- Krol, R. M., Hawkins, W. E., & Overstreet, R. M. (1992). Reproductive components. In *Microscopic Anatomy of Invertebrates, Decapoda, Crustacea, Vol. 10* (Eds FW Harrison, and AG Humes.) pp. 295–343.
- López Greco, L. S. (2013). Functional anatomy of the reproductive system. In L. Watling & M. Thiel (Eds.), *Functional Morphology and Diversity* (pp. 201-223). Oxford University Press.
- López Greco, L. S., Fransozo, V., Negreiros-Fransozo, M. L., & Santos, D. (2009). Morphology of the seminal receptacles of *Ocypode quadrata* (Brachyura, Ocypodoidea) in a comparative approach within Eubrachyura. *Zootaxa*, 2106, 41-50. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.2106.1.3>
- McLay, C. L., & Becker, C. (2015). Reproduction in brachyura. In *Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea, Volume 9 Part C (2 vols)* (pp. 185-243). Brill.
- Melo, G. A. S. (1996). *Manual de identificação dos Brachyura (caranguejos e siris) do litoral Brasileiro*. Editora Plêiade; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
- Nagao, J., & Munehara, H. (2003). Annual cycle of testicular maturation in the helmet crab *Telmessus cheiragonus*. *Fisheries science*, 69(6), 1200-1208. <https://doi.org/10.1111/j.0919-9268.2003.00746.x>
- Nicolau, C. F., Nascimento, A. A., Machado-Santos, C., Sales, A., & Oshiro, L. M. (2012). Gonads of males and females of the mangrove tree crab *Aratus pisonii* (Grapsidae: Brachyura: Decapoda): a histological and histochemical view. *Acta Zoologica*, 93(2), 222-230. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2011.00516.x>
- Ng, P. K., Guinot, D., & Davie, P. J. (2008). Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. *The raffles bulletin of zoology*, 17(1), 1-286.
- Palacios Theil, E. P., Cuesta, J. A., & Felder, D. L. (2016). Molecular evidence for non-monophyly of the pinnotheroid crabs (Crustacea: Brachyura: Pinnotheroidea), warranting taxonomic reappraisal. *Invertebrate Systematics*, 30(1), 1-27. <https://doi.org/10.1071/IS15023>
- Pinheiro, M. A., Santana, W., Bezerra, L. E. A., Kriegler, N., & Rio, J. P. (2016). Avaliação dos Caranguejos Grapsídeos (Decapoda: Grapsidae). In: *Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014*, 182-191.
- Santos, L. C. M., Boos, H., Sano, E. E., de Freitas, D. M., & Pinheiro, M. A. A. (2022). Management and conservation of the land crab *Cardisoma guanhumi* (Crustacea: Gecarcinidae) based on environmental and fishery factors: a case study in Brazil. *Wetlands Ecology and Management*, 30(2), 389-403. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842009000100021>
- Santos, C. M., Lima, G. V., Nascimento, A. A., Sales, A., & Oshiro, L. M. Y. (2009). Histological and histochemical analysis of the gonadal development of males

- and females of *Armases rubripes* (Rathbun 1897)(Crustacea, Brachyura, Sesarmidae). *Brazilian Journal of Biology*, 69, 161-169.
- Sant'Anna, B. S., Pinheiro, M. A. A., Mataqueiro, M., & Zara, F. J. (2007). Spermathecae of the mangrove crab *Ucides cordatus*: a histological and histochemical view. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 87(4), 903-911.
- Schubart, C. D., Cannicci, S., Vannini, M., & Fratini, S. (2006). Molecular phylogeny of grapsoid crabs (Decapoda, Brachyura) and allies based on two mitochondrial genes and a proposal for refraining from current superfamily classification. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 44(3), 193-199.
- <https://doi.org/10.1111/j.1439-0469.2006.00354.x>
- Simeó, C. G., Ribes, E., & Rotllant, G. (2009). Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). *Tissue and Cell*, 41, 345-361. <https://doi.org/10.1111/azo.12420>
- Tiseo, G. R., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2014). Is cleistosperry and coenospermy related to sperm transfer? A comparative study of the male reproductive system of *Pachygrapsus transversus* and *Pachygrapsus gracilis* (Brachyura: Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology*, 34(6), 704-716. <https://doi.org/10.1163/1937240X-00002275>
- Tiseo, G. R., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2017). Ultrastructure of spermatophores and spermatozoa of intertidal crabs *Pachygrapsus transversus*, *Pachygrapsus gracilis* and *Geograpsus lividus* (Decapoda: Grapsidae). *Zoologischer Anzeiger-A Journal of Comparative Zoology*, 269, 166-176. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2017.07.002>
- Tsang, L. M., Ahyong, S. T., Shih, H. T., & Ng, P. K. (2018). Further polyphyly of pinnotheroid crabs: the molecular phylogenetic position of the polychaete-associated Aphanodactylidae. *Invertebrate systematics*, 32(1), 92-99.
- Tsang, L. M., Schubart, C. D., Ahyong, S. T., Lai, J. C., Au, E. Y., Chan, T. Y., ... & Chu, K. H. (2014). Evolutionary history of true crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) and the origin of freshwater crabs. *Molecular biology and evolution*, 31(5), 1173-1187. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu068>
- Tsang, C. T. T., Schubart, C. D., Chu, K. H., Ng, P. K. L., & Tsang, L. M. (2022). Molecular phylogeny of Thoracotremata crabs (Decapoda, Brachyura): Toward adopting monophyletic superfamilies, invasion history into terrestrial habitats and multiple origins of symbiosis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 177, 107596. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2022.107596>
- Tudge, C. C. (2009). Spermatozoal morphology and its bearing on decapod phylogeny. In J. W. Martin, K. A. Crandall, & D. L. Felder (Eds.), *Decapod Crustacean Phylogenetics, Crustacean (Vol. 18, pp. 101-119)*. Taylor and Francis/CRC Press.
- Watson-Zink, V. M. (2021). Making the grade: physiological adaptations to terrestrial environments in decapod crabs. *Arthropod Structure & Development*, 64, 101089. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2021.101089>
- Wolfe, J. M., Ballou, L., Luque, R., Watson-Zink, V. M., Ahyong, S. T., Barido-Sottani, J., ... & Bracken-Grissom, H. D. (2022). Convergent adaptation of true crabs (Decapoda: Brachyura) to a gradient of terrestrial environments. *BioRxiv*, 2022-12. <https://doi.org/10.1101/2022.12.09.519815>
- Wolfe, J. M., Breinholt, J. W., Crandall, K. A., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., Timm, L. E., ... & Bracken-Grissom, H. D. (2019). A phylogenomic framework, evolutionary timeline and genomic resources for comparative studies of decapod crustaceans. *Proceedings of the Royal Society B*, 286(1901), 20190079.

- WoRMS (2023). Brachyura. Accessed at: <https://www.marinespecies.org/aphia.php?p=taxdetails&id=106673> on 2023-08-14
- Zara, F. J., Pereira, G. R. R., & Sant' Anna, B. S. (2014). Morphological changes in the seminal receptacle during ovarian development in the speckled swimming crab *Arenaeus cribrarius*. *The Biological Bulletin*, 227(1), 19-32. <https://doi.org/10.1086/BBLv227n1p19>
- Zara, F. J., Toyama, M. H., Caetano, F. H., & López-Greco, L. S. (2012). Spermatogenesis, Spermatophore, and Seminal Fluid Production in the adult Blue Crab, *Callinectes danae* (Portunidae). *Journal of Crustacean Biology*, 32(2), 249-262. <https://doi.org/10.1163/193724011X615479>

Considerações finais

Na presente tese, o sistema reprodutor masculino e a ultraestrutura dos espermatozoides de diferentes espécies brasileiras de crustáceos pertencentes às famílias Pinnotheridae, Varunidae, Sesarmidae, Grapsidae, Gecarcinidae, Ocypodidae e Ucididae foram descritos. O foco dado ao estudo do sistema reprodutor masculino foi na presença e morfologia das glândulas acessórias e no padrão de armazenamento dos espermatóforos/espermatozoides no vaso deferente, para auxiliar no entendimento das relações de parentesco e verificar padrões morfológicos de espécies em uma mesma família. Com isso, foi proposto que os Thoracotremata possuem longa MVD e na transição desta região com a PVD, abrem-se as glândulas acessórias que tem a função de produzir secreção com diferentes aspectos, dependendo da família estudada. Além disso, foi proposta uma filogenia com base em dados moleculares para auxiliar nas discussões das relações de parentesco e evolução do sistema reprodutor entre os diferentes táxons, as quais estão em concordância com os estudos filogenéticos da literatura (Tsang et al., 2014, 2022). Os espermatóforos mostraram parede desenvolvida, mas nunca mucosas, apresentando uma matriz interna positiva para proteínas e polissacarídeos ácidos, sendo estas características consideradas plesiomórficas em Thoracotremata.

A ultraestrutura dos espermatozoides indicou que caracteres como opérculo perfurado, botão apical, anel opercular acessório, aba periopercular, anel espessado eletrodenso e ausência de anel xantídeo modificado, são características ancestrais (plesiomórficas) para Thoracotremata, com algumas variações na ocorrência destes caracteres em algumas famílias.

Portanto, este estudo refuta a hipótese inicial que existem características do sistema reprodutor e espermatozoides robustos e exclusivos para a separação das espécies de Thoracotremata estudadas nas superfamílias Pinnotheroidea, Grapsoidea e Ocypodoidea. Porém, as famílias de Thoracotremata podem apresentar caracteres exclusivos, sinapomorfias, as quais podem ocorrer como homoplasias em outras famílias não proximamente relacionadas, estando de acordo com o teste de hipótese para este estudo.