
**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

**Rio Claro – SP
2023**

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
Biociências, 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 Biociências, 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:

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

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

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, o=ICP-Brasil, ou=Secretaria da Receita Federal do Brasil - RFB, ou=RFB e-CF A3, ou=(EM BRANCO), ou=presencial, ou=11733236000192, 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 memorian*), 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, electrodense 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 Plagusiidae.....	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 aquarioria (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 *et 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, Ocypodoidea 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 Ocypodoidea 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 Ocypodoidea (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 Ocypodoidea.

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 Ocypodoidea 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 guanhumi* 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 Ocypodoidea *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., Ah Yong, 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 *Austinia* (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 ocypodoid crabs with special reference to the genera *Metaplex* 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>

Capítulo I

**Múltiplas ferramentas para contar a história evolutiva do sistema
reprodutor masculino em caranguejos Thoracotremata**

Resumo

Neste capítulo foi descrita a anatomia, histologia e histoquímica do sistema reprodutor masculino das espécies brasileiras com ampla ocorrência de Pinnotheridae, Varunidae, Sesarmidae, Grapsidae, Gecarcinidae, Ocypodidae e Ucididae, com enfoque na presença ou ausência de glândulas acessórias e no padrão de armazenamento dos espermatóforos/espermatozoides no vaso deferente, com intuito de propor pela primeira vez uma padronização da descrição do sistema reprodutor masculino para Thoracotremata. Adicionalmente, foi proposta uma filogenia baseada em dados moleculares, para que em posse da árvore filogenética, esta ferramenta auxiliasse na discussão das relações de parentesco e evolução do sistema reprodutor masculino entre os diferentes táxons. O sistema reprodutor masculino das espécies estudadas é formado por um órgão bilateral, em forma de “H”, composto por um par de testículos e um par de vasa deferentia. O testículo é histologicamente tubular e o vaso deferente é dividido em regiões anterior (AVD), média (MVD) e posterior (PVD). A AVD possui duas porções, a proximal (AVDp) e a distal (AVDd), sendo que o fluido seminal produzido nestas regiões auxilia na formação dos espermatóforos, os quais são observados a partir da região distal. Os espermatóforos mostraram parede desenvolvida, mas nunca mucosas, com matriz interna positiva para proteínas e polissacarídeos ácidos, sendo estas características plesiomórficas à Thoracotremata. A MVD e PVD produzem e armazenam material seminal. Todas as espécies estudadas exibiram a presença de glândulas acessórias (AG), que se abrem na região de transição entre a MVD e PVD e secretam grande quantidade de fluido seminal, sendo este normalmente misturado ao fluido seminal do vaso deferente. As secreções produzidas pela MVD e AG podem funcionar para lubrificar os espermatóforos na transferência espermática, uma vez que nunca foram observados pacotes em Thoracotremata.

Palavras-chave: sistema reprodutor masculino, caranguejos verdadeiros; espermatozoides.

Introdução

Thoracotremata Guinot, 1977 agrupa espécies com grande diversidade ecológica, morfológica e comportamental, constituindo a maior radiação de caranguejos em ambientes terrestres e semi-terrestres (Tsang et al., 2022). Nesta seção estão os pequenos caranguejos Pinnotheroidea de Haan, 1833, encontrados em ambientes marinhos e estuarinos e simbiontes obrigatórios de corruptos (infraordem Axiidea de Saint Laurent, 1979), moluscos, equinodermos e outros invertebrados (Castro, 2015). Por outro lado, representantes das superfamílias Grapsoidea MacLeay, 1838 e Ocypodoidea Rafinesque, 1815 são animais de vida livre e representam a transição entre ambientes marinhos e terrestres (Eliss, 1968). Estes caranguejos são em geral, semi-terrestres e toleraram ampla variação de salinidade, podendo ser encontrados em água salgada e salobra (padrão mais comum) e até em ambientes dulcícolas, como no caso ímpar de *Grapsus grapsus* (Linnaeus, 1758) registrado na ilha da Trindade, Brasil (Arai et al., 2017). Alguns de seus representantes são encontrados exclusivamente em ilhas oceânicas, porém a maioria das espécies habita praias rochosas e, arenosas, sendo típicos de regiões estuarinas e manguezais (Eliss, 1968; Melo, 1996; Mantelatto et al., 2020).

Em Thoracotremata, a posição filogenética das superfamílias tem mostrado divergência entre as abordagens morfológicas e moleculares. Guinot (1977), com base em dados morfológicos, como o aumento do esterno torácico e a posição dos gonóporos, sistematizou Thoracotremata em quatro superfamílias monofiléticas: Cryptochiroidea Paul's son, 1875, Grapsoidea, Ocypodoidea e Pinnotheroidea. Por outro lado, estudos moleculares propuseram que as superfamílias não são monofiléticas, com polifilia demonstrada para as famílias em Ocypodoidea e Grapsoidea (Kitaura et al., 2002; Schubart et al., 2006; Tsang et al., 2014, 2022; Wolfe et al., 2022, não revisado por pares). Os Ocypodoidea das famílias Mictyridae Dana, 1951, e Macrophthalmidae Dana, 1851 agruparam-se junto com a família Varunidae (H. Milne Edwards, 1853) de Grapsoidea com alto suporte filogenético (Tsang et al., 2014, 2022). Além disso, no robusto “preprint” de Wolfe et al. (2022), fica claro a ampla polifilia nas várias famílias de Ocypodoidea e Grapsoidea. Estes autores demonstraram que diferentes famílias de Grapsoidea são divididas em cinco clados, sendo três agrupados com famílias de Ocypodoidea. As principais diferenças entre os estudos de Tsang et al. (2014, 2022) e Wolfe et al. (2022) foram relacionadas à posição taxonômica de Dotillidae Stimpson, 1858, a separação de Cryptochiridae e Pinnotheridae de Haan, 1833 e a posição sempre

variável nas filogenias para a família Plagusiidae Dana, 1851. De qualquer maneira, todos estes autores confirmam os Ocypodoidea Mictyridae e Macrophthalmidae como grupo irmão do Grapsoidea, Varunidae (Tsang et al., 2014, 2022; Wolfe et al., 2022).

O sistema reprodutor masculino (SRM) em caranguejos é bilateral, composto por um par de testículos e um par de *vasa deferentia* (Krol et al., 1992; López Greco, 2013, McLay & Becker, 2015). Do ponto de vista anatômico, o sistema reprodutor pode ter a forma de "H", "U" invertido ou "V". No testículo ocorre os processos de espermatogênese e espermiogênese, que culminam na produção de espermatozoides imóveis e aflagelados (Krol et al., 1992; McLay & Becker, 2015; Zara et al., 2012; Oliveira & Zara, 2018; Garcia Bento et al., 2019). De acordo com a organização para a maturação das células germinativas até a produção do espermatozoide, o testículo pode ser classificado histologicamente como lobular ou tubular (para revisão, Nagao & Manehara, 2003; Simeó et al., 2009; McLay & Becker, 2015; Garcia Bento et al., 2019; Watanabe et al., 2020).

O vaso deferente tem a função de receber os espermatozoides e produzir os espermatóforos. Em grande parte dos decápodes, os espermatóforos são do tipo coenoespérmicos, ou seja, apresentam vários espermatozoides em cada espermatóforo (Anilkumar et al., 1999; Watanabe et al., 2020, 2022). Nos caranguejos basais (Podotremata), várias secreções envolvem um longo cordão espermático central, levando a produção de um longo espermatóforo único transferido como “pasta de dente” para a espermateca das fêmeas (McLay et al., 2001; Garcia Bento et al., 2019, 2022). No restante dos caranguejos verdadeiros (Heterotremata e Thoracotremata), incluindo os caranguejos de água doce Trichodactylidae, numerosos espermatóforos coenoespérmicos são observados no vaso deferente. Em geral estes espermatóforos são esféricos, contendo poucos ou muitos espermatozoides, envoltos por camada acelular mucosa ou rígida, formando uma parede (pellicle) (Anilkumar et al., 1999; Klaus et al., 2009, 2013; Oliveira & Zara, 2018; Watanabe et al., 2022). Por outro lado, em várias espécies de caranguejos de água doce do velho mundo e uma espécie em Grapsidae MacLeay, 1838 *Pachygrapsus gracilis* (de Saussure, 1857), os espermatóforos são cleistoespérmicos, ou seja, um espermatozoide por espermatóforo (Guinot et al., 1997; Klaus et al., 2009; Klaus e Brandis, 2011; Tiseo et al., 2014, 2017).

O vaso deferente em Brachyura Latreille, 1802 é tradicionalmente dividido em três regiões: anterior (AVD), média (MVD) e posterior (PVD) (Krol et al., 1992; Tiseo et al., 2014; Garcia Bento et al., 2019). Praticamente em todos os Eubrachyura de Saint

Laurent, 1980, a AVD é a região onde ocorre a formação dos espermátóforos. A porção proximal (AVDp) é responsável pela formação das massas espermáticas, enquanto a porção distal da AVD produz as secreções adicionais que formam os espermátóforos, mucosos ou com parede (Zara et al., 2012; Nascimento & Zara, 2013; Antunes et al., 2018; Watanabe et al., 2020, 2022). Em geral, a MVD, armazena espermátóforos e a PVD, que também pode armazenar espermátóforos, geralmente contribui com boa parte da produção do fluido seminal (Diesel, 1989; Simeó et al., 2009; Zara et al., 2012; Tiseo et al., 2014; Antunes et al., 2018; Oliveira & Zara, 2018; Assugeni et al., 2021; Watanabe et al., 2020, 2022). Associado a MVD ou a PVD, ou em ambas, podem ocorrer diferentes projeções epiteliais as quais receberam diferentes nomes na literatura científica, como “divertículos” ou “caecas” (Diesel, 1989; Simeó et al., 2009), “expansões” (Garcia & Silva, 2006), “evaginações” (Castilho et al., 2008), “outpockets” (Johnson, 1980; Zara et al., 2012; Watanabe et al., 2020, 2022), “apêndices” (Becker et al., 2013), “glândulas sexuais acessórias em forma de coral” (Sundhadevi & Adiyodi, 1995) e “glândulas acessórias” (AG), sendo este o mais correto do ponto de vista histológico (Simeó et al., 2009, Tiseo et al., 2014; Oliveira & Zara, 2018; Antunes et al., 2018). No Oregoniida *Chionoecetes opilio* (Fabricius, 1788), as AG, chamadas de caecas ocorrem em todas as regiões do vaso deferente, sendo a PVD ausente de espermátóforos (Beninger et al., 1988, 1993; Benhalima & Moriyasu, 2000). No Majidae Samouelle, 1819 *Maja brachydactyla* Balss 1922, na MVD ocorre a estocagem dos espermátóforos e as glândulas são chamadas de “divertículos”. Por sua vez, nesta mesma espécie, na PVD estas expansões recebem o nome de AG e, tanto a PVD como as AG têm papel de misturar fluido seminal aos espermátóforos (Simeó et al., 2009).

Em Portunidae Rafinesque, 1815, várias espécies de *Callinectes* Stimpson 1860, *Arenaeus cribrarius* (Lamarck, 1818) e *Charybdis hellerii* (A. Milne-Edwards, 1867) possuem outpockets (*sensu* Johnson, 1980) na MVD e PVD, as quais não são glândulas propriamente ditas, mas sim dobras envaginadas do epitélio destas regiões, com função de aumentar o volume de fluido seminal (Johnson, 1980; Zara et al., 2012; Watanabe et al., 2020; 2022). Em todos estes Portunidae, a PVD não apresenta espermátóforos e o grande volume seminal de *Callinectes* spp. e *A. cribrarius* são responsáveis pela formação do plug espermático, evitando competição espermática (Zara et al., 2012, 2014; Assugeni et al., 2021; Watanabe et al. 2020). Porém em *Ch. hellerii*, devido ao baixo volume de fluido seminal, é proposto que a ausência de espermátóforos na PVD pode produzir a formação de pacotes ou estratos espermáticos, levando a competição espermática

(Watanabe et al., 2022). Após a transferência espermática, a formação de pacotes espermáticos no receptáculo seminal é demonstrada em espécies que apresentam conjuntos de AG tubulares na região de transição entre a MVD e PVD, ou ao longo da PVD, onde espermatóforos também estão ausentes, como demonstrado para Inachoididae e Oregoniidae e proposto para Trichodactylidae H. Milne Edwards, 1853 (Diesel, 1989, 1991; Urbani et al., 1998; Antunes et al., 2016, 2018; Oliveira & Zara, 2018).

Em Thoracotremata são escassos os estudos com o SRM e existem descrições para a produção de espermatóforos na AVD ou MVD, além da função de armazenamento destes na PVD ou em AG (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). Assim, não há uma padronização das regiões anatômicas e suas funções. Além disso, na transição entre a MVD e PVD ocorrem as AG, as quais foram descritas com termos e composição química muito variada, sem uma função ou padrão estrutural claro. Em *Cardissoma guanhumi* Latreille in Latreille, LePeletier, Seville & Guérin, 1828, as AG foram descritas como PVD e a PVD, como ducto ejaculatório, sendo este erroneamente classificado como tendo epitélio pseudoestratificado. Várias funções foram propostas para as AGs, desde secretar, estocar fluido seminal e espermatóforos até produção de agente antibacteriano, catalizador de deiscência e agente para “destruição” de excesso de espermatozoide (Shinozaki-Mendes et al., 2012). Porém, polissacarídeos ácidos não são observados no fluido seminal, somente nos interiores dos espermatóforos, o que inviabiliza ao menos a função antibactericida (para revisão ver Johnson, 1980; Sasikala and Subramoniam, 1987; Beninger et al., 1993; Jensen et al., 1996; Benhalima and Moriyasu, 2000).

Em *Aratus pisonii* (H. Milne Edwards, 1937), *Armases rubripes* (Rathbun, 1897), *Goniopsis cruenta* (Latreille 1803) e *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), a AG produz secreção contendo polissacarídeos neutros, em alguns casos pode ou não apresentar polissacarídeos ácidos, sendo glicoproteica para *Go. cruentata* (Garcia & Silva, 2006, Castilho et al., 2008; Santos et al., 2009; Nicolau et al., 2012). Em *Parasesarma plicatum* (Latreille, 1806), *Pachygrapsus transversus* (Gibbes, 1850), *Pa. gracilis*, *Ocypode cerathophthalmus* (Pallas, 1772), grandes grânulos de secreção estão presentes na glândula exócrina, sendo estes compostos por polissacarídeos ácido e neutros, com pequena ou intensa reatividade para proteínas (SundhaDevi & Adiyodi, 1995; Tiseo et al., 2014; Ganapiriya et al., 2017). Contudo, para todas estas espécies, nenhuma outra função foi atribuída ou discutida para as AG e a transferência espermática. Apesar de posicionada

exclusivamente na PVD, e sem caracterização histoquímica da secreção, as AG de *Pinnotheres pisum* (Linnaeus, 1767) e *Nepinnotheres pinnotheres* (Linnaeus, 1758) tem função de aumentar o volume de fluido seminal e lubrificar os espermatozoides durante a transferência espermática (Becker et al., 2013). Assim, nada envolvendo a presença ou ausência de competição espermática, no momento da fertilização, foi proposto para Thoracotremata.

Embora existam descrições do SRM em Thoracotremata, estas são isoladas e não permitem uma visão global da evolução morfológica neste grupo. Assim, o objetivo deste capítulo foi descrever a morfo-histologia e histoquímica do SRM em Pinnotheroidea, Grapsoidea e Ocypodoidea, enfatizando aspectos que, relacionados com a filogenia molecular, podem ser úteis para entender as relações de parentesco e a evolução do SRM entre os diferentes táxons. Além disso, também buscamos padronizar as descrições das regiões do SRM, características histoquímicas e ultraestruturais das secreções e anatomia das AG, as quais não foram previamente descritas ou estão inconsistentes. Nosso teste de hipótese supõe que o SRM apresenta caracteres sinapomórficos para família, superfamília ou para Thoracotremata, permitindo traçar a evolução morfológica por integração com a filogenia molecular.

Material e Métodos

Animais

As espécies deste capítulo (Tabela I) foram coletadas em diversos ambientes costeiros, como manguezais, estuários, praias arenosas, costões rochosos e ilhas oceânicas entre outubro de 2019 a janeiro de 2022 nos municípios de Ipojuca em Porto de Galinhas no Estado de Pernambuco, Paraty, Estado do Rio de Janeiro, Ubatuba, São Vicente, Cananéia e Ilha Comprida, Estado de São Paulo, Brasil. Em geral, os indivíduos foram capturados manualmente ou com utilização de bombas de sucção, mais frequentemente no período de maré baixa durante o dia ou a noite. Os animais coletados foram transportados vivos em caixas de isopor para o Laboratório de Morfologia de Invertebrados do Departamento de Biologia, Faculdade de Ciências Agrárias, FCAV, UNESP- Jaboticabal, onde foram mantidos vivos em terrários (1 a 2 dias) até o momento da dissecação e processamento. A coleta e transporte dos indivíduos obedeceram às leis brasileiras (licença permanente, MMASISBIO número 34587 e Sisgen). Os animais

foram identificados por meio de diferentes chaves de identificação, sendo a de Melo (1996), a mais frequente.

Anatomia, histologia e histoquímica

Para a descrição anatômica do SRM, machos maduros foram anestesiados por resfriamento, sendo dissecados ou mantidos em paraformaldeído 4% em tampão fosfato 0,2M (pH 7,2) em água do mar, por até 48h, para posterior dissecação. Em solução tampão, os SRM dos representantes de cada grupo foram fotografados em estereomicroscópio Leica MZ sob contraste interdiferencial de Hoffman e as imagens foram obtidas com o uso do programa Leica® LAS.

Para histologia e histoquímica, os sistemas reprodutores utilizados para as descrições anatômicas foram processados seguindo a rotina para historesina. Para tal, após a fixação por 24 horas, as amostras foram submetidas a dois banhos no mesmo tampão (10 minutos cada), desidratadas em séries crescentes de álcool (70 a 95 %) e embebidas e incluídas em historesina Leica® (glico-metacrilato). Os cortes seriados (5 a 7µm) foram obtidos em micrótomo rotativo Leica® e recolhidos em lâminas para posterior coloração. Para a análise histológica de rotina, o material foi corado com hematoxilina e eosina (Junqueira & Junqueira, 1983). Para histoquímica, as amostras foram coradas quanto à distribuição de proteínas, por meio da técnica de Xylidine ponceau (Mello & Vidal, 1980), polissacarídeos neutros e ácidos, com o uso das técnicas do ácido periódico de Schiff (PAS) e Azul de Alcian 2,5 %, respectivamente, além do conjugado PAS/Alcian Blue 2,5% (Junqueira & Junqueira, 1983).

Microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise do fluido seminal e parede dos espermatóforos, pequenas porções do vaso deferente médio (1mm³) das diferentes espécies, foram fixadas em solução Karnovsky (glutaraldeído 2.5% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,4) por 4 horas. Em seguida, as amostras foram submetidas a três lavagens no mesmo em tampão (10 minutos cada), sendo pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% durante 2 horas, no mesmo tampão. Após três lavagens, os materiais foram contrastados “em Bloc” com acetato de uranila 1% aquoso (overnight, 4°C). A desidratação foi realizada em sequência ascendente de banhos de acetona (50 a 95%) e as amostras foram incluídas em resina Epon - Araldite. Os cortes ultrafinos (50 nm) foram obtidos no ultramicrotomo Leica UC7, com uso de navalha de diamante. As grades com cortes foram

contrastadas em acetato de uranila 5% em água por 45 minutos e citrato de chumbo 0,5% em NaOH 0,1 N por 10 minutos. As amostras foram analisadas no MET Jeol JEM - 1010 com aceleração eletrônica de 80KV e as imagens digitalmente captadas com uso da câmera Gatan no Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV, UNESP – Campus de Jaboticabal.

A fim de padronizar a classificação do fluido seminal e parede dos espermatozóides, foram selecionados para análise apenas os espermatozóides obtidos na MVD.

Análise filogenética

Para a obtenção das árvores filogenéticas, foram utilizadas 156 espécies e sequências disponíveis na plataforma GenBank empregando 11 marcadores moleculares: três mitocondriais (COI, 12S e 16S rRNA), seis genes codificadores de proteínas nucleares (nPCGs) (AK, Eno, GAPDH, H3, NaK, PEPCK) e dois nPCGs (F1F0-ATP subunidade beta sintase (ATPS) e proteína associada ao spliceossomo (SAP) (material complementar) (material complementar).

Para as análises, foram selecionadas todas as sequências utilizadas no trabalho de Tsang et al. (2022) além de espécies alvo deste estudo, a fim de aumentar o suporte de ramo da árvore filogenética. Posteriormente, as espécies que não foram alvo do trabalho foram retiradas da topologia utilizando o pacote “ape” (Paradis & Schliep, 2019) no software R versão 4.2.1.

O alinhamento do consenso de todas as sequências utilizadas na filogenia foi realizado utilizando o programa MAFFT (Katoh & Standley, 2016) no incorporado no software Geneious 2023.0 (Kearse et al. 2012). Uma árvore filogenética de máxima verossimilhança (ML) foi gerada utilizando o programa IQ-TREE (Trifinopoulos et al. 2016), com todos os marcadores moleculares concatenados. O modelo evolutivo que melhor se ajustou aos dados foi determinado por IQ-TREE de acordo com o Bayesian Information Criterion (BIC) (Luo et al. 2010) e utilizado para inferência da árvore. Os suportes de ramo foram avaliados utilizando o método de bootstrap ultra-rápido com 1000 réplicas.

Resultados

Anatomia

O SRM das espécies estudadas apresentam um modelo geral formado por um órgão bilateralmente simétrico em forma de "H", consistindo em um par de testículos (Fig. 1A-O), localizados nas margens superiores do cefalotórax, com uma comissura localizada sobre o intestino, logo após o estômago. Estes desembocam em um par de *vasa deferentia*, que se estendem longitudinalmente, abaixo do coração, terminando na região posterior do corpo dos machos, junto a abertura ventral dos gonóporos. O testículo é um órgão tubular convoluto (Fig. 1A, C, E, H, L e M). Anatomicamente, o vaso deferente é dividido em três regiões: a anterior (AVD), que se distingue por ser mais delgada e convoluta; a média (MVD) em geral mais volumosa, a posterior (PVD), mais delgada e contínua com o ducto ejaculatório. Na região de transição entre a MVD e PVD, nota-se a presença de AG, e após esta, a PVD é contínua com ducto ejaculatório (Fig. 1A- O).

As AG apresentam variação em sua morfologia macroscópica, sendo possível identificar padrões específicos para as famílias de Thoracotremata. Em Pinnotheridae (*A. patagoniensis* e *D. crinitichelis*), as AG têm origem a partir de um único ponto no vaso deferente. Estas estruturas formam vários ramos tubulares medianos e mais distantes entre si. A porção distal do túbulo, que termina em fundo cego único, é mais dilatada (Fig. 1A e B). Nos Ocypodidae, as numerosas AG de *U. cordatus* e *M. mordax*, são curtas, espessas, com túbulos próximos uns dos outros, os quais terminam em fundo cego (Fig. 1C). Por sua vez, em *O. quadrata* (Fabricius, 1787) as glândulas são ligeiramente mais alongadas, delgadas e terminam em curta anastomose com fundo cego (Fig. 1D). Nos varunídeos, as AG desembocam como tubo único em um só ponto do vaso deferente. Deste ramo único, segue uma anastomose a qual produz ramos tubulares de tamanhos distintos, próximos entre si, longos, e terminando em fundo cego para *C. integer* (Fig. 1E). Em *N. granulata*, do túbulo único conectado ao vaso deferente, parte uma anastomose com ramos desiguais, mais curtos e volumosos (Fig. 1F). Em todos os Grapsidae, as glândulas desembocam de maneira independente, porém muito próximas umas das outras, na transição MVD e PVD. Cada túbulo da AG é digitiforme, ligeiramente delgado e terminam em fundo cego (Fig. 1G). Nos representantes da família Sesarmidae Dana, 1851, incluindo *S. rectum*, *Ar. angustipes*, *Ar. rubripes* e *A. pisonii*, as AG tubulares desembocam em único ponto do vaso. Deste ponto, uma anastomose produz dois ramos curtos, sem saída na porção posterior (Fig. 1H - K). Gecarcinidae mostra dois

padrões para a AG: em *J. lagostoma*, as glândulas são túbulos robustos terminando em fundo cego (Fig. 1L); em *C. guanhumi*, as glândulas são bastante alongadas com ramificação terminal curta (Fig. 1M). No Plagusiidae *P. depressa*, a AVD, com túbulos delgados e convolutos é contínua com a alongada MVD, que se mostra como um tubo espesso e convoluto. As AG desembocam em um único ponto da transição MVD/PVD, sendo cada túbulo delgado, longo e sem anastomose, terminando em fundo cego (Fig. 1P e Q). As glândulas ramificadas, originando-se apenas de um único ponto do vaso deferente e apresentam superfície enrugada (Fig. 1P e Q).

Histologia e histoquímica

Testículo

Em todas as espécies estudadas o testículo é classificado como do tipo tubular, exibindo em um único túbulo células em diferentes estágios de maturação, representando as diferentes fases dos processos de espermatogênese e espermiogênese. O túbulo seminífero é dividido em três zonas não sequenciais: zona germinativa, zona de transformação e zona de evacuação (Fig. 2A – G). A zona germinativa, normalmente localizada na periferia do túbulo seminífero, encontra-se repleta de espermatogônias, as quais se caracterizam por apresentar núcleo volumoso, com citoplasma levemente acidófilo (Fig. 2H). A zona de transformação está preenchida por espermatócitos primários, secundários ou espermátides em diferentes fases da espermiogênese, dependendo da região do túbulo. A distribuição das zonas é aleatória ao longo do testículo (Fig. 2I – M). Os espermatócitos primários apresentam volumosos núcleos em diferentes estágios da prófase meiótica (Fig. 2I). Por sua vez, os espermatócitos secundários exibem núcleos basófilos menos volumosos, com cromatina homogênea (Fig. 2J). A espermiogênese tem início com espermátides iniciais, as quais exibem núcleo basófilo e arredondado, sendo que a vesícula acrossomal circular corada ao PAS passa a ser observada (Fig. 2K). As espermátides intermediárias são marcadas pelo início da modificação nuclear e vesícula acrossomal, os quais tornam-se mais achatados. Nesta fase, observa-se na vesícula acrossomal positiva ao PAS, uma região mais fortemente corada a este corante, representando o desenvolvimento da câmara perforatorial e região opercular (Fig. 2L). Nos estágios mais finais, as espermátides passam a apresentar núcleo reduzido e uma vesícula acrossomal com aspecto mais heterogêneo, com a câmara perforatorial fortemente corada ao PAS, disposta no lado oposto ao núcleo basófilo (Fig.

2M). Os espermatozoides maduros encontram-se na zona de evacuação e exibem núcleo mais delgado com a presença dos braços radiais, parecendo estar envolvido pela heterogênea vesícula acrossomal (Fig. 2N).

Vaso deferente e glândulas acessórias

Pinnotheridae

Uma vez formados, os espermatozoides maduros de *A. patagoniensis* e *D. crinitichelis* são encaminhados ao vaso deferente. A AVD é constituída por duas porções: a proximal (AVDp) e a distal (AVDd), sendo que ambas as porções exibem epitélio do tipo colunar simples, com núcleos basófilos e citoplasmas acidófilos (Fig. 3A e B). No lúmen da AVDp, uma grande massa de espermatozoides encontra-se imersa em secreção levemente basófila, denominada secreção do tipo um (SI) (Fig. 3A). Além disso, na periferia desta região, observa-se um outro tipo de secreção acidófila, a secreção do tipo dois (SII) (Fig. 3A). Na AVDd, a SII torna-se mais espessa, auxiliando na formação dos espermatóforos coenospermicos. A parede dos espermatóforos é claramente visível, basófila e com espermatozoides, os quais estão imersos em SI (Fig. 3B). Ambas as regiões da AVD apresentam a mesma composição histoquímica para as suas secreções, sendo que a SI é fracamente positiva para proteínas (Fig. 3C) e polissacarídeos neutros (Fig. 3D), porém negativa para polissacarídeos ácidos (Fig. 3E). A SII é fortemente reativa para proteínas, fracamente reativa para polissacarídeos neutros e reativa para polissacarídeos ácidos (Fig. 3C – E).

A MVD está dividida em duas porções: a proximal (MVDp) e a distal (MVDd). A MVDp é o local onde os espermatóforos estão armazenados (Fig. 3F - H). Os espermatóforos com os espermatozoides na SI, passam a ser externamente embebidos por uma maior quantidade de SII. Adicionalmente, um outro tipo de secreção granular, denominada secreção do tipo três (SIII) passa a ser observada (Fig. 3F e G). Na MVDd, não são observados espermatóforos, somente SII e SIII estão presentes. A MVDd é contínua com a curta PVD, estando disposta logo após a AG (Fig. 3H). A PVD está preenchida pela mesma secreção da MVD, sendo ausente de espermatóforos, como ocorre na MVDd (Fig. 3H). A PVD é contínua com o ducto ejaculatório, que porta espessa camada muscular, e está inserido no gonopódio I (Fig. 3I e J). Histoquimicamente, as secreções da MVD e PVD são idênticas. A SIII é homogeneamente marcada para proteínas ao Xylidine Ponceau, com reação fracamente positiva (Fig. 3K). Quando corada

para polissacarídeos, a SIII é heterogênea, mostrando intensa reação cortical para polissacarídeos neutros e ácidos, sendo a medula positiva para ambos os polissacarídeos testados (Fig. 3L e M). Na MVD e PVD o epitélio é do tipo pavimentoso à cúbico simples e as SI e SII permanecem com a mesma composição química da AVD, enquanto a SIII, granular é levemente basófila (Fig. 3G), negativa para proteínas (Fig. 3K) e fracamente reativa para polissacarídeos neutros (Fig. 3L) e ácidos (Fig. 3M). A parede dos espermatóforos é levemente basófila (Fig. 3G), fracamente positiva para proteínas (Fig. 3K), fortemente reativa para polissacarídeos neutros (Fig. 3L) e negativa para polissacarídeos ácidos (Fig. 3M).

Na transição MVD e PVD abrem-se as glândulas acessórias exócrinas com aspecto tubular simples (Fig. 3N). Não existe mistura do material glandular e do vaso seminal antes da cópula. O epitélio da glândula é simples com variação entre cúbico e achatado, sendo o citoplasma basófilo (Fig 3N e O). No lúmen, ocorre um quarto tipo de secreção (SIV), também granular. Os grandes grânulos, levemente basófilos, são formados pela fusão de grânulos menores, sendo a fusão mais facilmente observada na periferia luminal, junto ao ápice do epitélio (Fig. 3N e O). A secreção granular IV tem coloração homogênea, diferente da SIII, sendo para proteínas, fracamente positiva e intensamente marcada para polissacarídeos neutros e ácidos (Fig. 3P - R). Por entre a SIV, existe uma pequena quantidade de matriz, a secreção do tipo cinco (SV), acidófila ou eosinófila, muito reativa para proteínas e aos dois tipos de polissacarídeos estudados (Fig. 3O - R). O epitélio das AG é positivo para proteínas, fracamente marcado para polissacarídeos neutros e negativo para os ácidos (Fig. 3P - R).

Ocypodidae

Em *O. quadrata*, *M. mordax* e *U. cordatus* a AVD apresenta epitélio escamoso a colunar simples e é dividida em AVDp e AVDd (Fig. 4A). No lúmen da AVDp nota-se uma grande massa de espermatozoides imersos em secreção basófila, denominada secreção do tipo um (SI) e na periferia desta região, próxima ao epitélio, observa-se um outro tipo de secreção acidófila, nomeada secreção do tipo II (SII) (Fig. 4A e B). Na AVDd, os espermatozoides permanecem imersos em SI e há um aumento da produção de SII, com aspecto mais viscoso, contribuindo para a separação da SI em massas menores levando a formação dos espermatóforos, envoltos por parede (Fig. 4C). Histoquimicamente, a SI em ambas as porções da AVD mostra-se fracamente positiva para proteínas (Fig. 4D), porém reativa a polissacarídeos neutros (Fig. 4E) e ácidos (Fig.

4F). A SII é fortemente proteica, reativa para polissacarídeos neutros e fracamente positiva para ácidos (Fig. 4D - F). A parede dos espermátóforos mostra-se basófila, proteica, fortemente positiva para polissacarídeos neutros e ácidos.

No lúmen da MVD, gotas irregulares de secreção começam a ser observadas sobre a matriz acidófila de SII, a qual foi denominada secreção do tipo III (SIII). O epitélio é simples e pavimentoso com camada de musculatura bem mais espessa que o epitélio (Fig. 4G). Em *O. quadrata*, *U. cordatus* e *M. mordax*, a SIII é negativa para proteínas (Fig. 4H), porém fortemente positiva para polissacarídeos neutros (Fig. 4I) e ácidos (Fig. 4J). A SII permanece fortemente proteica, reativa para polissacarídeos neutros e fracamente reativa para ácidos (Fig. 4H - J). A parede dos espermátóforos mantém sua característica química não alterada, após a formação na AVDd (Fig. 4H - J).

A transição da MVD/PVD é marcada pela abertura do par de glândulas acessórias como túbulos, simples no vaso deferente. É possível notar que a secreção da MVD tem espermátóforos até a transição (Fig. 4K). O material glandular tem mistura com o material da MVD, porém a quantidade de material glandular liberado para a PVD parece ser significativa (Fig. 4L). O fluido seminal produzido pelas glândulas foi nomeado de secreção do tipo quatro (SIV) para o grânulo e secreção do tipo cinco (SV) para a matriz entre os grânulos. Em *O. quadrata*, *U. cordatus* e *M. mordax*, a SIV mostra-se basófila (Fig. 4M e U) e os grânulos SIV são positivos para proteínas, fortemente reativos para polissacarídeos neutros e ácidos, já a SV é fortemente positiva para proteínas e polissacarídeos neutros, sendo reativa a polissacarídeos ácidos (Fig. 4N - S). Em *U. cordatus*, os grânulos de SIV são menores e variam de arredondados a alongados, já a SV tem aspecto fibroso (Fig. 4M, O, P e R). Em *O. quadrata* e *M. mordax* a SIV são grânulos esféricos e de maior tamanho, sendo a SV com aspecto fluídico (Fig. 4N, O e S). A SV tem aspecto fibroso (Fig. 4M, O, P e R).

Após a glândula, a PVD tem relativa mistura de secreção glandular e do vaso, proveniente da MVD, resultando em um produto glandular que torna os espermátóforos ainda mais espaçados. Todavia, as secreções da PVD posterior e do ducto ejaculatório não apresentam alterações em suas características químicas após a mistura da mesma (Fig. 4T - Y).

Varunidae

A AVD de *C. integer*, *Cyr. angulatus* e *N. granulata* é formada pela AVDp e AVDd, apresentando epitélio variando de colunar simples à cúbico simples. Na AVDp uma grande massa de espermatozoides livres está imersa em secreção acidófila, a secreção do tipo um (SI) (Fig. 5A e B), a qual mostra-se reativa para proteínas (Fig. 5C) e polissacarídeos neutros (Fig. 5D) e ácidos (Fig. 5E). Na periferia luminal, sobre o ápice do epitélio, observa-se um outro tipo de secreção, a tipo dois (SII) que é acidófila, fortemente proteica, reativa para polissacarídeos neutros e negativa para ácidos (Fig. 5A - E). Esta secreção SII auxilia a separação das massas espermáticas, formando os espermatóforos, eventos os quais podem ser observados em diferentes graus de compactação na AVDd (Fig. 5F). A SI permanecerá como a matriz ao redor dos espermatozoides, no interior dos espermatóforos, e é acidófila, com fraca reação para proteínas (Fig. 5G), polissacarídeos neutros (Fig. 5H) e positiva para os ácidos (Fig. 5I). Na AVDd, a SII, onde os espermatóforos estão imersos, mantém as características observada na AVDp, sendo reativa para proteínas e polissacarídeos neutros e ácidos. As únicas diferenças observadas são que esta secreção na AVDd se torna ligeiramente mais espessa e volumosa (Fig. 5F - I).

Na MVD, o epitélio permanece colunar simples, mas mostra núcleos irregulares. Adicionalmente, os espermatóforos no lúmen e a secreção que envolve os espermatóforos, continuam com as mesmas características histológicas e histoquímicas observadas na AVD, sendo o volume de SII maior (Fig. 5J - O).

As AG abrem-se na transição entre MVD e a PVD, marcando o início desta última. Estas estruturas são túbulos com anastomose, produzindo túbulos de diferentes tamanhos. A secreção glandular tem mecanismo merócrino e forma a secreção do tipo três (SIII), com grânulos de diferentes tamanhos e basófilos (Fig. 5P e Q). Tais grânulos da SIII são levemente corados para proteínas (Fig. 5R) e fortemente positivos para polissacarídeos neutros (Fig. 5S) e ácidos (Fig. 5T). Entre os grânulos, ocorre uma matriz SIV fluída, basófila, com a mesma característica química dos grânulos (Fig. 5 Q - T).

Na PVD após as glândulas acessórias, o epitélio permanece cúbico simples. No lúmen desta região, observa-se a mistura das secreções da MVD, a SII e das AG, a SIII. Porém, parece ocorrer uma preponderância da SII da MVD em relação a SIII e SIV das AG (Fig. 5U). As mesmas características químicas de SII, SIII e SIV, além de poucos

espermatóforos distantes um dos outros, são as características principais da PVD (Fig. 5U – Y).

Grapsidae

A análise do SRM de *G. lividus*, *Go. cruentata*, *Gr. grapsus*, *Pa. transversus* e *Pa. gracilis* exibem de maneira geral, a existência de dois padrões morfológicos em grapsídeos: 1) AVD dividida em AVDp e AVDd, com a presença de espermatóforos do tipo coenospérmicos e 2) AVD não dividida em duas regiões e com a presença de espermatóforos cleistospérmicos, como ocorreu em *Pa. gracilis*. Nas espécies que exibem o primeiro padrão, nota-se que a AVD possui epitélio pavimentoso simples, no qual as células exibem núcleo basófilo e citoplasma acidófilo. No lúmen da AVDp, observa-se a presença de uma grande massa de espermatozoides, imersa em secreção, denominada secreção do tipo I. Adicionalmente, um outro tipo de secreção acidófila é observado, principalmente na periferia do vaso, a qual foi classificada como secreção do tipo dois (SII) (Fig. 6A). Na AVDd, a SII torna-se mais espessa, auxiliando a formação da parede dos espermatóforos, sendo que em seu interior, os espermatozoides permanecem imersos em SI (Fig. 6B - C). Em ambas as regiões, observa-se que a SI é pouco basófila e levemente reativa para proteínas, polissacarídeos neutros e ácidos (Fig. 6D - F). A SII é acidófila em *Go. cruentata*, *Gr. grapsus* e *Pa. transversus*, porém, mais basófila em *G. lividus* (Fig. 6C). Histoquimicamente, a SII é positiva para proteínas e polissacarídeos neutros (Fig. 6D e E) e negativa para ácidos (Fig. 6F), em todas as espécies estudadas. As paredes dos espermatóforos observadas a partir da AVDd mostram-se levemente basófilas, fortemente reativa a proteínas e positivas apenas a polissacarídeos neutros (Fig. 6A – F).

Em *Pa. gracilis*, os espermatozoides em cleistospermia, estão envoltos por matriz SI, sendo esta secreção sem reação a HE, onde apenas os espermatozoides são corados para esta técnica (Fig. 6G). A SI é fracamente positiva para proteínas (Fig. 6H) e reativa para polissacarídeos neutros e ácidos (Fig. 6I e J). A SII que envolve os espermatóforos é acidófila, positiva para proteínas e polissacarídeos neutros, sendo negativa para polissacarídeos ácidos (Fig. 6G - J). Já a parede dos espermatóforos mostra-se basófila, positiva para proteínas e polissacarídeos neutros (Fig. 6G – I).

Na MVD, nota-se que a SI e a SII permanecem com a mesmas características observadas na AVD. Entretanto, há o aparecimento de um outro tipo de secreção

denominada secreção do tipo III (SIII), com morfologia semelhante a um grânulo, basófilo, com superfície sinuosa em *Gr. grapsus* ou grânulos pequenos, elípticos e numerosos em *Go. cruentata* (Fig. 6K e L). No restante das espécies, a SIII acidófila, forma grânulos perfeitamente esféricos (Fig. 6M - O). Nas espécies com espermatóforos coenospérmicos, a SIII é fracamente positiva para proteínas e polissacarídeos neutros (Fig. 6N e O). Por sua vez, a SIII é intensamente corada para polissacarídeos ácidos (Fig. 6P). No grapsídeo cleistospémico *Pa. gracilis*, a SIII acidófila é intensamente reativa para todas as técnicas testadas (Fig. 6Q - T).

Em todos os grapsídeos, as AG abram-se na transição da MVD e PVD como túbulos individuais formando uma coroa nesta região. Nota-se a mistura das secreções da MVD e da glândula, com predominância qualitativa de material glandular (Fig. 6U). Na glândula, ocorre uma secreção tipo quatro (SIV) granular e intensamente basófila, entremeada por uma delgada matriz acidófila da secreção tipo V (SV) (Fig. 6V e W). Diferente das outras espécies, *Pachygrapsus* spp. tem tanto a SIV como a SV acidófilas (Fig. 6Y), sendo que em *Pa. gracilis*, a acidofilia destas é pouco marcada (Fig. 6Z). Em termos histoquímicos, todas as espécies estudadas, com exceção de *Pachygrapsus*, mostraram a SIV e SV fracamente reativa para proteínas, sendo positiva aos polissacarídeos (Fig. 7A - D). Em *Pa. transversus*, tais secreções são fortemente reativas a proteínas, com fraca reação para polissacarídeos (Fig. 7E - G). Por sua vez, em *Pa. gracilis*, o resultado histoquímico foi o inverso de *Pa. transversus*, com baixa afinidade para proteínas e intensa marcação aos polissacarídeos neutros e ácidos (Fig. 7H - J).

Na PVD após as glândulas acessórias e ducto ejaculatório, observa-se a mistura dos fluidos glandulares (SIV) com as secreções advindas das diferentes regiões do vaso deferente (SI, SII e SIII), principalmente da MVD, levando ao menor número de espermatóforos nesta região, sendo distantes uns dos outros (Fig. 7K - O). Em geral, parece haver, qualitativamente, uma maior quantidade de secreção glandular na PVD. Os compostos SIII e SIV podem ser identificados pela diferença de reação histoquímica, exceto quando corados para proteínas, uma vez que ambos são fracamente positivos (Fig. 7L). Em *Pachygrapsus*, todas as secreções apresentam a mesma composição química observada na MVD e AG, sendo em *Pa. transversus* (Fig. 7M - O), as SIII e SIV mostram reação oposta a verificada em *Pa. gracilis* (Fig. 7P - R).

Sesarmidae

Nas espécies *A. pisonii*, *Ar. angustipes*, *Ar. rubripes* e *S. rectum* os vasos deferentes também são formados pela AVD [dividida em AVDp e AVDd], MVD e PVD. Na AVDp observa-se a presença dos espermatozoides livres imersos em uma matriz de secreção basófila (Fig. 8A), a secreção do tipo um (SI), a qual é fracamente positiva para proteínas (Fig. 8B) e positiva para polissacarídeos neutros (Fig. 8C) e ácidos (Fig. 8D). Na periferia da AVDp observa-se ainda um outro tipo de secreção mais fortemente basófila, positiva para proteínas, pouca reativa para polissacarídeos neutros e negativa para polissacarídeos ácidos (Fig. 8 B - D). Esta secreção foi classificada como secreção do tipo dois (SII). Na AVDd, a SII passa a compor a parede dos espermatóforos envolvendo os espermatozoides, sendo facilmente observados por sua parede basófila (Fig. 8E), intensamente reativa para proteínas (Fig. 8F) e polissacarídeos neutros (Fig. 8G), sendo reativa para os ácidos (Fig. 8H). Os espermatozoides no interior dos espermatóforos estão imersos em SI, que continua sendo basófila, positiva para polissacarídeos neutros e ácidos, fracamente positiva para proteínas (Fig. 8E – H). Por sua vez, os espermatóforos estão imersos em SII, a qual é basófila, fortemente proteica, reativa a polissacarídeos neutros e negativa à polissacarídeos ácidos (Fig. 8E – H). O epitélio nestas regiões varia de cúbico a pavimentoso simples (Fig. 8E).

Em geral, na MVD o epitélio segue o mesmo padrão da AVD, sendo o pavimentoso o mais comum de ser observado. No lúmen desta região, muitos espermatóforos de tamanhos variáveis, pouco espaçados entre si, parecem estar acumulados nesta área e estão imersos em SII. Ainda é possível verificar um novo tipo de secreção, a do tipo três (SIII), composta por grânulos muito acidófilos, assim como a SII, de tamanho homogêneo e perfeitamente esféricos (Fig. 8I e J). A SII, a qual é uma matriz que circunda os grânulos de SIII, é formada por secreção fortemente positiva para proteínas (Fig. 8K), positiva para polissacarídeos neutros e fortemente positiva para ácidos (Fig. 8L - M). Os grânulos esféricos da SIII são fortemente proteicos e negativos para polissacarídeos ácidos. Todavia, exibem intensa marcação cortical para polissacarídeos neutros, sendo a medula positiva ao PAS (Fig. 8K – M). A SI no interior dos espermatóforos é basófila (Fig. 5I e J), fracamente proteica (Fig. 8K) e, nesta região, é positiva para polissacarídeos neutros (Fig. 8L) e intensamente positiva para os ácidos (Fig. 8M), alterando a sua intensidade desde a AVD. Adicionalmente, entre as espécies

estudadas, observa-se dois padrões histoquímicos de SI quando as lâminas foram submetidas ao PAS.

Na transição entre a MVD e a PVD, as AG liberam seus produtos no vaso deferente (Fig. 8N). Cada túbulo glandular se abre de maneira independente, sequencial, uma ao lado do outro. Próximo a abertura das glândulas, em alguns casos, observa-se espermatóforos em seu interior (Fig. 8N - Q). A secreção das AG são duas: 1) a tipo quatro (SIV), sendo intensamente proteica, formando grânulos perfeitamente esféricos, porém, maiores que os grânulos da SIII (Fig. 8O). A SIV, mostrou marcação para polissacarídeos apenas no córtex dos grânulos (Fig. 8P - Q) e 2) a secreção tipo cinco (SV), a qual é uma matriz proteica, positiva a polissacarídeos (Fig. 8O - Q). Grande quantidade de secreção granular acidófila ocupa o lúmen da transição MVD/ PVD, fazendo com que o material da MVD pareça parcialmente separado do restante da PVD (Fig. 8N, R -U). Contudo, ao longo da PVD, o material da MVD pode ser observado, principalmente demonstrado pela presença de espermatóforos, os quais são poucos e distantes uns dos outros. A característica química do fluido seminal da PVD segue o padrão observado na MVD e PVD (Fig. 8R - U).

Gecarcinidae

Nos gecarcinídeos *Cardisoma guanhumi* e *Johngarthia lagostoma*, a AVD é dividida em AVDp e AVDd devido a formação dos espermatóforos. Em ambas as regiões, o epitélio é do tipo pavimentoso à cúbico simples com células contendo núcleo fortemente basófilo e citoplasma levemente acidófilo. A AVDp caracteriza-se pela presença de espermatozoides livres imersos na secreção do tipo um (SI), basófila, a qual mantém os espermatozoides em uma grande massa espermática, em geral, central, no lúmen. Na periferia desta região do vaso deferente, ocorre um outro tipo de secreção, a qual foi nomeada por secreção do tipo II (SII), acidófila e muito abundante sobre a forma de grânulos coagulados em *J. lagostoma* (Fig. 9A e B). Na AVDd a SII torna-se progressivamente mais abundante, levando a separação das massas dos espermatozoides em estruturas arredondadas, os espermatóforos coenospérmicos. Os espermatozoides, no interior dos espermatóforos, continuam imersos em SI basófila (Fig. 9C e D). Em Gecarcinidae, a SI foi fracamente positiva para proteínas e positiva para ambos os polissacarídeos testados. A SII acidófila, foi positiva para proteínas e polissacarídeos. Contudo, em *C. guanhumi* a SII foi fortemente positiva para proteínas ao Xylidine

ponceau (Fig. 9F). Em ambas as porções e espécies, a parede dos espermatóforos mostram-se basófilas, positivas para proteínas e polissacarídeos (Fig. 9C – H).

A MVD é formada por epitélio pavimentoso simples (Fig. 9I). Adicionalmente, em seu lúmen, observam-se muitos espermatóforos, com parede e SI exibindo as mesmas características químicas da AVDd, com exceção da forte reação a polissacarídeos ácidos e assim como o aumento de sua espessura. Por sua vez, na região média, a SII passa a ser acompanhada por um novo tipo de secreção, denominada secreção do tipo III (SIII). Em ambas as espécies, a matriz de SII é acidófila (Fig. 9I e J), fortemente reativa para proteínas (Fig. 9K) e fracamente positiva para polissacarídeos neutros e ácidos (Fig. 9L e M). A SIII é constituída por grânulos basófilos e de caráter glicoproteico (Fig. 9K - M).

As AG são túbulos que desembocam na transição MVD/PVD. As glândulas apresentam epitélio pavimentoso simples, com núcleos alongados e assentadas sobre camada muscular. Estas AG produzem grande quantidade de secreções que relembram às observadas na MVD, por serem granulares (Fig. 9N – Q). A quarta secreção (a SIV) é composta por grânulos esféricos menores que a SIII, da MVD, levemente acidófilos, fracamente positivos para proteínas, positivos para polissacarídeos ácidos e intensamente marcados para polissacarídeos neutros (Fig. 9N - Q).

Na PVD após a glândula, os poucos espermatóforos tornam-se mais espaçados, devido a maior deposição de fluido seminal, com mistura de secreção da MVD e PVD, sendo, qualitativamente maior a presença de material glândular. As características químicas da sua região de produção, MVD ou AG, é mantida, porém os grânulos das SIII e SIV são indiferenciados para a técnica de proteínas. Estes são diferenciados por ligeira maior intensidade quanto a técnica de PAS e menor intensidade de marcação para azul de Alcian (Fig. 9R - U).

Plagusiidae

A AVD de *P. depressa* é formada por epitélio colunar simples mostrando citoplasma acidófilo e núcleos elípticos basófilos (Fig. 10A). Os espermatozoides estão imersos em secreção do tipo I (SI) e não são observados espermatóforos coenospérmicos nesta região. Assim, nesta espécie não é possível verificar a divisão em porção proximal e distal na AVD. Na AVD, a SI basófila (Fig. 10A e B), fortemente proteica, reativa para polissacarídeos neutros e ácidos (Fig. 10C - E). A MVD é caracterizada pela imensa quantidade de espermatozoides basófilos no lúmen e pela presença da secreção do tipo

dois (SII) levemente basófila, ao longo do vaso deferente (Fig. 10F e G). O epitélio da MVD é pavimentoso simples recoberto por camadas musculares algumas vezes mais espessas que o tecido do epitélio (Fig. 10H). A SII é fracamente positiva para proteínas e fortemente reativa a polissacarídeos neutros e ácidos (Fig. 10I - K). Adicionalmente, a SII encontra-se imersa em SI, a qual na MVD mantém a mesma característica química da AVD.

Na transição da MVD para a PVD, nota-se a abertura independente das AG, formando uma coroa nesta região. Adicionalmente, pode-se constatar grande quantidade de secreção glandular misturando-se com as secreções da MVD (Fig. 10L e M). Estas glândulas produzem secreção liberada por mecanismo merócrino, devido ao epitélio profundamente achatado e recoberto por musculatura mais espessa que o epitélio (Fig. 10N). A secreção das AG tem aspecto finamente granular, devido aos pequenos grânulos acidófilos da secreção do tipo três (SIII), imersa em matriz que preenche os delgados espaços entre os grânulos, denominada de secreção tipo quatro (SIV). Estes produtos glandulares exibem forte reatividade a proteínas, sendo fracamente reativos para polissacarídeos neutros e negativos aos ácidos (Fig. 10O - Q). O epitélio da PVD é pavimentoso, simples e no ápice dele, na região luminal, espermatozoides em espermatóforos cleistospérmicos, são observados (Fig. 10R). As secreções provenientes da MVD, como a SII e das AG, SIII e SIV, mantem a mesma característica química descrita na região da PVD após a glândula (Fig. 10S - U).

Ultraestrutura dos espermatóforos e fluido seminal

Em todos os Thoracotremata estudados nesta tese, os espermatóforos apresentaram parede (pellicle), com tamanho e organização variável, não ocorrendo espermatóforos do tipo mucoso (Fig. 11A - Z). Nos pinoterídeos *A. patagoniensis* e *D. crinitichelis*, os espermatóforos são constituídos por parede delgada lisa formada por três camadas, produzindo uma estrutura trilaminar. As duas camadas eletrodensas dispostas nas periferias da parede, uma em contato com a secreção interna do espermatóforo e outra em contato com o fluido seminal. A camada menos eletrolúcida é mais espessa que as eletrodensas. Em ambas as espécies, os espermatozoides estão imersos em uma matriz menos eletrodensa que o material luminal. Os espermatóforos encontram-se envoltos por uma matriz eletrodensa, na qual grânulos menos eletrodensos são observados (Fig. 11A e B).

No Ocypodidae *O. quadrata*, os espermatozoides estão imersos em secreção finamente granular pouco eletrodensa. O espermatóforo possui parede mais eletrodensa que as secreções do lúmen do vaso deferente e da matriz espermatofórica granular (Fig. 11C e D). Em *M. mordax*, a secreção em que os espermatozoides se encontram imersos é formada por uma matriz homogênea, finamente granular e ligeiramente menos eletrodensa que o fluido seminal, onde grânulos eletrodensos, de diferentes tamanhos e com aspecto granular e coagulado, são observados. A parede dos espermatóforos é espessa e constituída por cinco camadas com diferentes eletrodensidades (Fig. 11E e F). Em *U. cordatus*, a secreção no interior dos espermatóforos é mais eletrodensa e granular que o fluido seminal. A ondulada parede do espermatóforo é formada por delgada película eletrodensa. A matriz ao redor dos espermatóforos é menos eletrodensa que o fluido seminal do interior dos espermatóforos, mostrando grânulos eletrodensos de diferentes tamanhos (Fig. 11G e H).

Nos Varunidae *C. integer*, *N. granulata* e *Cyr. angulatus*, os espermatozoides estão imersos em secreção menos eletrodensa que o fluido seminal, sendo esta matriz granular. A parede dos espermatóforos é formada por película eletrodensa granular. Por sua vez, o fluido seminal ao redor dos espermatóforos é mais eletrodenso que a matriz ao redor dos espermatozoides e, além disso, observam-se grande grânulos eletrodensos e gotas eletrolúcidas (Fig. 11I e J).

Entre os Grapsidae, nota-se que em *Gr. grapsus*, *G. lividus* e *Go. cruentata*, os espermatozoides no interior dos espermatóforos, estão imersos em secreção finamente eletrodensa e granular (Fig. 11K e L). A parede dos espermatóforos é constituída por delgada película eletrodensa e ondulada, sendo o fluido seminal ao redor dos espermatóforos granular e mais eletrodenso com grânulos de distintos tamanhos e eletrodensidades (Fig. 11K e L). Por sua vez, nas espécies de *Pachygrapsus*, a secreção em que os espermatozoides estão imersos é pouco eletrodensa e finamente granular (Fig. 11M – P). A parede dos espermatóforos em *Pa. transversus* é relativamente espessa, formada por três camadas: uma externa eletrodensa e delgada que está em contato com o fluido seminal; a intermediária menos eletrodensa, com espessura variável, sinuosa e espessa. A camada mais interna é delgada e mais eletrodensa que a intermediária, acompanhando as sinuosidades da camada média, estando em contato com a secreção do interior dos espermatóforos (Fig. 11M e N). Em *Pa. gracilis*, os espermatóforos são cleistospérmicos e tem relativa quantidade de matriz circundante ao espermatozoide até a parede do espermatóforo. A matriz é pouco eletrodensa e com grânulos finos e esparsos.

A parede formada por duas camadas, a externa eletrodensa e delgada, em contato com a secreção luminal do vaso deferente, e outra camada relativamente mais espessa e menos eletrodensa, em contato com a matriz do espermatóforo (Fig. 11O e P).

As espécies de Sesarmidae exibem a parede e a matriz secretória mais distinta de todas as outras famílias estudadas. A parede nas espécies de *Armases* mostra-se espessa e levemente ondulada, com a presença de pequenos pontos que parecem ser canalículos em corte transversal, com aspecto mais eletrodense e em contato com a secreção do interior dos espermatóforos (Fig. 11Q e R). Para *A. pisonii* e *S. rectum*, a parede é espessa, porém com material que lembram canalículos em corte longitudinal, produzindo um aspecto estriado (Fig. 11S e T). Em todas as espécies estudadas, os espermatozoides encontram-se imersos em secreção menos eletrodensa que a parede e cada espermatozoide está intimamente circundado por uma camada de material mais eletrodense que a matriz espermatofórica (Fig. 11U). O fluido seminal é composto por grânulos grandes com medula eletrodensa e córtex menos eletrodense, sendo os limites entre ambos bem claros. Tais grânulos estão dispersos em uma matriz grosseiramente granular (Fig. 11Q – T).

Nos gecarcinídeos estudados, o interior dos espermatóforos é composto por secreção eletrodensa e grosseiramente granular. A parede dos espermatóforos é muito delgada, ondulada e formada por duas camadas ou películas, uma eletrodensa em contato com a secreção interna dos espermatóforos e outra menos eletrodensa em contato com a secreção do vaso deferente. O fluido seminal ao redor dos espermatóforos é pouco eletrodense, com delicados e finos grânulos diminutos. Grânulos eletrodensos de diversos tamanhos encontram-se imersos na matriz seminal pouco eletrodensa (Fig. 11V e W).

A parede dos espermatóforos cleistospérmicos do plagusiídeo *P. depressa* é espessa, lisa e mais eletrodensa que a secreção luminal do vaso deferente. Entre a parede e o espermatozoide praticamente não existe matriz, como acontece ao redor dos espermatozoides de Sesarmidae (Fig. 11U). O fluido seminal da MVD em que os espermatóforos estão imersos, é composta por uma matriz homogênea, onde ocorrem grânulos pouco eletrodensos, com córtex levemente mais eletrodensos de diferentes tamanhos (Fig. 11Y e Z).

Análise filogenética

A árvore evolutiva obtida por máxima verossimilhança oferece suporte à monofilia de Thoracotremata sendo formada por dois grandes clados, com valores de suporte expressos em bootstrap. Em relação às superfamílias, Pinnotheroidea é monofilética, enquanto Ocypodoidea e Grapsoidea são polifiléticas para as famílias. No primeiro clado, os táxons da família Pinnotheridae foram agrupados como grupo irmão de Ocypodidae. No segundo grande clado, os ocipodóideos da família Xenophthalmidae e Dotillidae foram separados das outras famílias analisadas, formando um grupo irmão. As famílias Varunidae, Grapsidae, Sesarmidae e Plagusiidae foram identificadas como monofiléticas. Varunidae e Macrophthalmidae formam grupo irmão, e juntos, são grupo irmão de Mictyridae. Os grapsóideos da família Xenograpsidae e Leptograpsidae mostram-se grupos irmãos dos Varunidae, Macrophthalmidae e Mictyridae e este grande clado é agrupado como irmão de Grapsidae e Percnidae. O último subclado é formado pelos representantes de Sesarmidae, Gecarcinidae e Plagusiidae. Glyptograpsidae é grupo irmão de todas as famílias do segundo grande clado, exceto à Xenophthalmidae e Dotillidae. Cryptochiridae também é monofilético e está separado das famílias do segundo grande clado (Fig. 12).

Tabela, figuras e legendas

Tabela 1. Espécies de Thoracotremata com dados morfológicos do sistema reprodutor masculino.

Superfamília e Família	Espécie	Referência
Grapsoidae		
Gecarcinidae	<i>Johngarthia lagostoma</i> (H. Milne Edwards, 1837)	Presente estudo
	<i>Cardisoma guanhumi</i> Latreille in Latreille, Le Peletier, Serville & Guérin, 1828	Shinozaki-Mendes et al., 2012; presente estudo
Grapsidae	<i>Pachygrapsus gracilis</i> (de Saussure, 1857)	Tiseo et al., 2014; presente estudo
	<i>Pachygrapsus transversus</i> (Gibbes, 1850)	Tiseo et al., 2014; presente estudo
	<i>Goniopsis cruentata</i> (Latreille, 1803)	Garcia & Silva, 2006; presente estudo
Plagusiidae	<i>Plagusia depressa</i> (Fabricius, 1775)	Presente estudo
Sesarmidae	<i>Aratus pisonii</i> (H. Milne Edwards, 1837) (H. Milne Edwards, 1837)	Hartnoll, 1965; Nicolau et al., 2012; presente estudo
	<i>Armases angustipes</i> Dana, 1852	Presente estudo
	<i>Armases rubripes</i> (Rathbun, 1897)	Santos et al., 2009; presente estudo
	<i>Sesarma rectum</i> Randall, 1840	Presente estudo
	<i>Parasesarma plicatum</i> (Latreille, 1803)	Ganapiriya et al. (2017)
	<i>Cyclograpsus integer</i> H. Milne Edwards, 1837	Presente estudo
Varunidae	<i>Cyrtograpsus angulatus</i> Dana, 1851	Presente estudo
	<i>Neohelice granulata</i> (Dana, 1851)	Presente estudo
Ocypodoidea		
Ocypodidae	<i>Ocypode cerathophthalmus</i> (Pallas, 1772)	SundhaDevi & Adiyodi, 1995
	<i>Ocypode quadrata</i> (Fabricius, 1787)	Presente estudo

Continuação na próxima página

<i>Ucides cordatus</i> (Linnaeus, 1763)	Castilho et al. (2008); presente estudo
<i>Leptuca thayeri</i> (Rathbun, 1900)	Benetti et al., 2008 (como <i>Uca thayeri</i>)
<i>Leptuca uruguayensis</i> (Nobili, 1901)	Cuartas & Sousa (2007)
<i>Uca maracoani</i> (Latreille, 1803)	Benetti et al., 2008
<i>Minuca vocator</i> (Herbst, 1804)	Benetti et al., 2008 (como <i>Uca vocator</i>)
<i>Minuca mordax</i> (Smith, 1870)	Presente estudo

Pinnotheroidea

Pinnotheridae

<i>Pinnixa</i> White, 1846 sp.	Reger, 1970
<i>Pinnotheres pisum</i> (Linnaeus, 1767)	Becker et al., 2013
<i>Nepinnotheres pinnotheres</i> (Linné, 1758)	Becker et al., 2013
<i>Austinixa patagoniensis</i> (Rathbun, 1918)	Presente estudo
<i>Dissodactylus crinitichelis</i> Moreira, 1901	Presente estudo

Figura 1

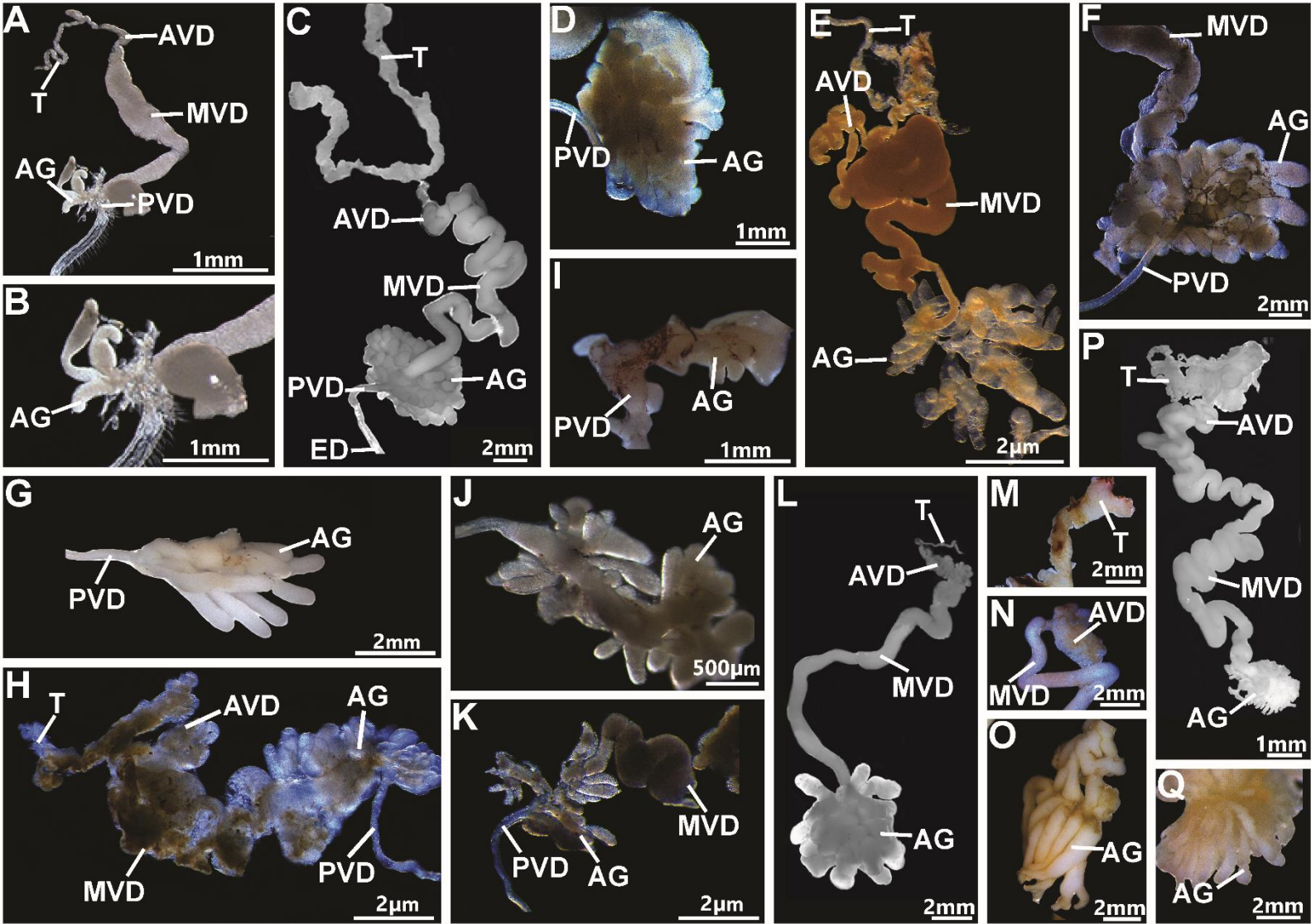


Figura 1. Anatomia do sistema reprodutor masculino em Thoracotremata. **A.** SRM de *A. patagoniensis*. Observe o testículo convoluto, seguido pela região anterior do vaso deferente (AVD). **B.** Detalhe das glândulas acessórias de *A. patagoniensis*. **C.** Sistema reprodutor masculino de *U. cordatus* representando a vista anatômica geral do sistema reprodutor de *Minuca mordax* e *Ocypode quadrata*. Note que a glândula em *U. cordatus* é curta, com túbulos próximos e sem ramificações aparentes. **D.** Detalhe das glândulas acessórias de *O. quadrata*. Neste Ocypodidae a glândula acessória é formada por ramos ligeiramente mais alongados e ramificados. **E.** Vista geral de uma das porções do SRM do Varunidae *C. integer*, representando o padrão geral observado em *N. granulata*. Note o par de testículos, seguido pela AVD convoluta e com diâmetro mais reduzido, quando comparado com a MVD e PVD. As AGs se desenvolvem a partir de um ponto do vaso deferente, com novos ramos tubulares surgindo a partir de outros ramos, sendo estes ramos alongados e próximos entre si. **F.** Zona de transição de MVD/ PVD contendo as glândulas acessórias de *N. granulata*. **G.** Detalhe das glândulas acessórias do Grapsidae *Go. cruentata*, exibindo glândulas acessórias tubulares alongadas e não ramificadas. Esta imagem representa o padrão observado em *Gr. grapsus*, *Pa. transversus* e *Pa. gracilis*. **H.** Aspecto geral de uma das porções do sistema reprodutor masculino do sesarmídeo *S. rectum*, também representando o padrão geral observado em *A. pisonii* e *Armases*. Note que as AGs tubulares surgem a partir de um único ponto do vaso e os ramos são curtos e menos distantes entre si. **I - J.** Detalhe da PVD e glândulas acessórias de *A. pisonii* e *Ar. angustipes*, respectivamente. **K.** Detalhe da MVD, PVD, e glândulas de *Ar. rubripes*. **L.** Sistema reprodutor masculino de *J. lagostoma*. Observe que as glândulas acessórias são não ramificadas e apresentam tamanho intermediário. **M.** Testículo com aspecto convoluto de *C. guanhumi*. **N.** Detalhe da AVD e MVD de *C. guanhumi*. **O.** Glândulas acessórias de *C. guanhumi*, as quais são bastante alongadas e apresentam ramificação terminal. **P.** Sistema reprodutor masculino do plagusídeo *P. depressa*, exibindo um pequeno fragmento testicular, seguido pela AVD e MVD. As AGs têm aspecto fino, alongado e não ramificado. **Q.** Detalhe das glândulas acessórias de *P. depressa*. Note que as glândulas acessórias possuem uma superfície enrugada. AG= glândulas acessórias; AVD= vaso deferente anterior, ED= ducto ejaculatório; MVD= vaso deferente médio; PVD= vaso deferente posterior; T= testículo.

Figura 2

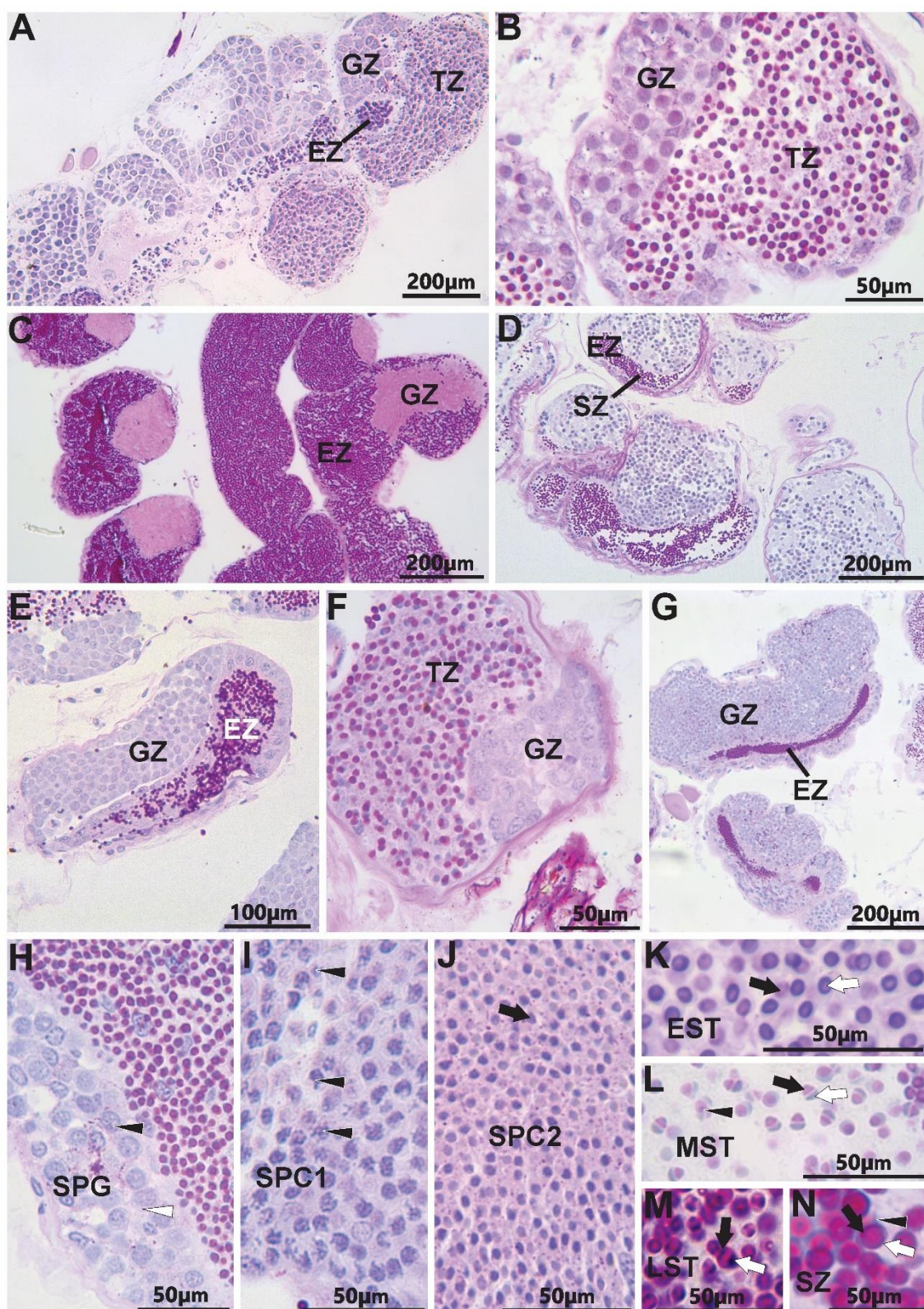


Figura 2. Testículo (espermatogênese e espermiogênese). **A – G.** Testículo do tipo tubular nas famílias de Thoracotremata analisadas. **A.** *Austinixa patagoniensis*; **B.** *Ucides cordatus*; **C.** *Cyclograpsus integer*; **D.** *Goniopsis cruentata*; **E.** *Armases rubripes*; **F.** *Johngarthia lagostoma*; **G e H.** *Plagusia depressa*; **I e J.** *Armases rubripes*; **K.** *Goniopsis cruentata*; **L.** *Geograpsus lividus*; **M.** *Sesarma rectum*; **N.** *Cardisoma guanhumi*. O túbulo seminífero é formado pelas zonas germinativa, de transformação e evacuação. **H – M.** Detalhe das diferentes zonas do túbulo seminífero, exibindo células em diferentes estágios da espermatogênese e espermiogênese. Todas as espécies exibem o mesmo padrão de maturação. **H.** Detalhe da zona germinativa de *P. depressa*, exibindo as espermatogônias com grande núcleo (cabeça de seta preta) e citoplasma levemente acidófilo (cabeça de seta branca). **I.** Espermatócitos primários em *Ar. rubripes* mostrando cromossomos em diferentes estágios da prófase meiótica (cabeça de seta). **J.** Espermatócitos secundários de *Ar. rubripes*, exibindo a redução dos núcleos basófilos com cromatina homogênea (seta). **K.** Espermátides iniciais de *Go. cruentata* com núcleos (seta branca) arredondados e a pequena vesícula acrossomal circular marcada ao PAS (seta preta). **L.** Espermátides intermediárias em *G. lividus* mostrando o início da modificação nuclear (seta branca) e vesícula acrossomal mais volumosa (seta preta). Na região mais fortemente corada (cabeça de seta) ocorre o desenvolvimento da câmara perforatorial e opérculo. **M.** Espermátides finais de *S. rectum* mostrando núcleo reduzido (seta branca) e vesícula acrossomal madura (seta preta). **N.** Espermatozoides maduros presentes na zona de evacuação de *C. guanhumi*. Note o delgado núcleo (seta branca) em “C”, exibindo os braços radiais (cabeça de seta) e a vesícula acrossomal (seta preta). Coloração: PAS-Hematoxilina. EST= espermátide inicial; EZ = zona de evacuação; GZ = zona germinativa; LST = espermátide final; MST = espermátide intermediária; SPG= espermatogônia; SPC1= espermatócito primário; SPC2= espermatócito secundário; SZ=espermatozoide; TZ = zona de transformação

Figura 3

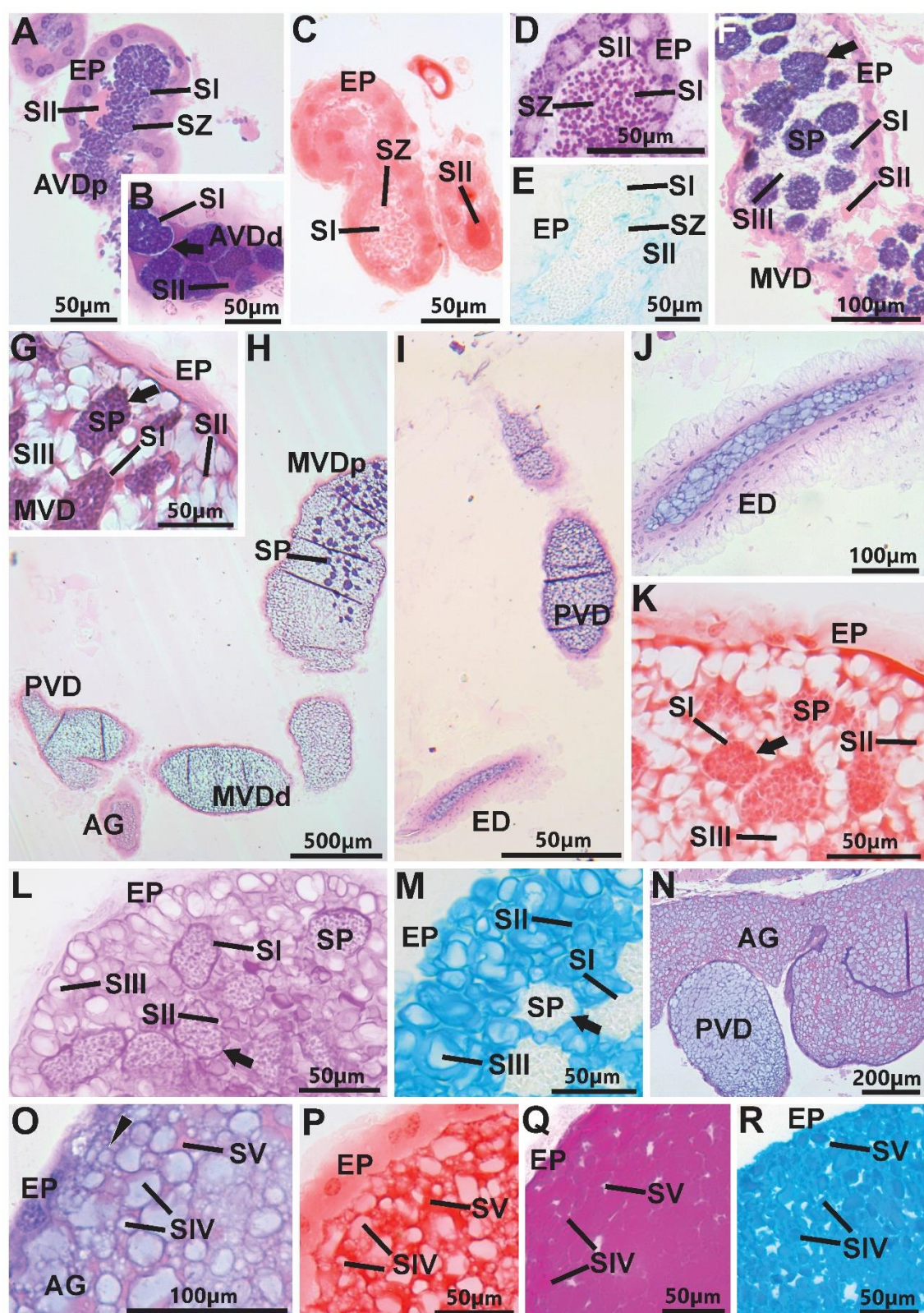


Figura 3. Histologia e histoquímica do vaso deferente e glândulas acessórias em *Pinnotheridae*. **A.** AVDp com espermatozoides imersos em SI levemente basófila e SII acidófila junto ao epitélio colunar simples. **B.** AVDd com a formação dos espermatóforos coenospérmicos, mostrando a parede basófila (seta preta) facilmente visível, entremeados pela SII. **C, D e E.** Histoquímica da AVDp e AVDd com SI pouco reativa para proteínas, polissacarídeos neutros e negativa para os ácidos. A SII, ainda pouco abundante, é fortemente reativa para proteínas, como fracamente positiva para polissacarídeos neutros e reativa para polissacarídeos ácidos. **F, G e H.** Diferentes ampliações da MVD contendo espermatóforos. A SI forma a matriz interna em associação com os espermatozoides que estão delimitados pela parede basófila (seta). A secreção SII eosinófila é mais abundante e entre elas ocorre do tipo três (SIII), muito abundante e levemente basófilas. **I e J.** PVD preenchida pela mesma secreção da MVD, com a ausência de espermatóforos. Note o ducto ejaculatório. **K, L e M.** MVD exibindo a SI e parede dos espermatóforos (seta) fracamente positiva para proteínas, intensamente reativa polissacarídeos neutros e negativa aos polissacarídeos ácidos. A SII mais abundante do que na AVD, tem caráter glicoproteico. Por sua vez, a os grânulos da SIII tem reação homogênea e fracamente positiva para proteínas, sendo os mesmos heterogêneos para polissacarídeos neutros e ácidos, onde a córtex é intensamente reativa para polissacarídeos neutros e ácidos, enquanto a medula é menos intensamente marcada para os neutros e positiva para os ácidos. **N, O, P, Q e R.** AG desembocando na PVD, caracterizando a transição MVD/PVD. No detalhe em **O**, nota-se o epitélio simples variando de cúbico a pavimentoso da AG, com citoplasma basófilo, positivo para proteínas, fracamente positivo para polissacarídeos neutro e negativo para os ácidos. Os grandes grânulos da SIV são formados por meio da fusão de grânulos menores (cabeça de seta), sendo homogeneamente corados, positivo para proteínas e intensamente reativos a polissacarídeos neutros e ácidos. Entre os grânulos de SIV ocorre uma matriz, a SV, intensamente marcada para proteínas e reativa para polissacarídeos neutros e ácidos. AG= glândulas acessórias; AVDd= região distal do vaso deferente anterior; AVDp= região proximal do vaso deferente anterior; ED= ducto ejaculatório; EP= Epitélio; MVD= vaso deferente médio; MVDd= porção distal do vaso deferente médio; MVDp= porção proximal do vaso deferente médio; PVD= vaso deferente posterior; SI= secreção do tipo um; SII= secreção do tipo dois; SIII= secreção do tipo três; SIV= secreção do tipo quatro; SV= secreção do tipo cinco; SP= espermatóforos; SZ= espermatozoides. Colorações:

HE= A, B, F, G, H, I, J, N, O; Xylidine ponceau= C, K, P; PAS= D, L, Q; Azul de Alcian= E, M, R.

Figura 4

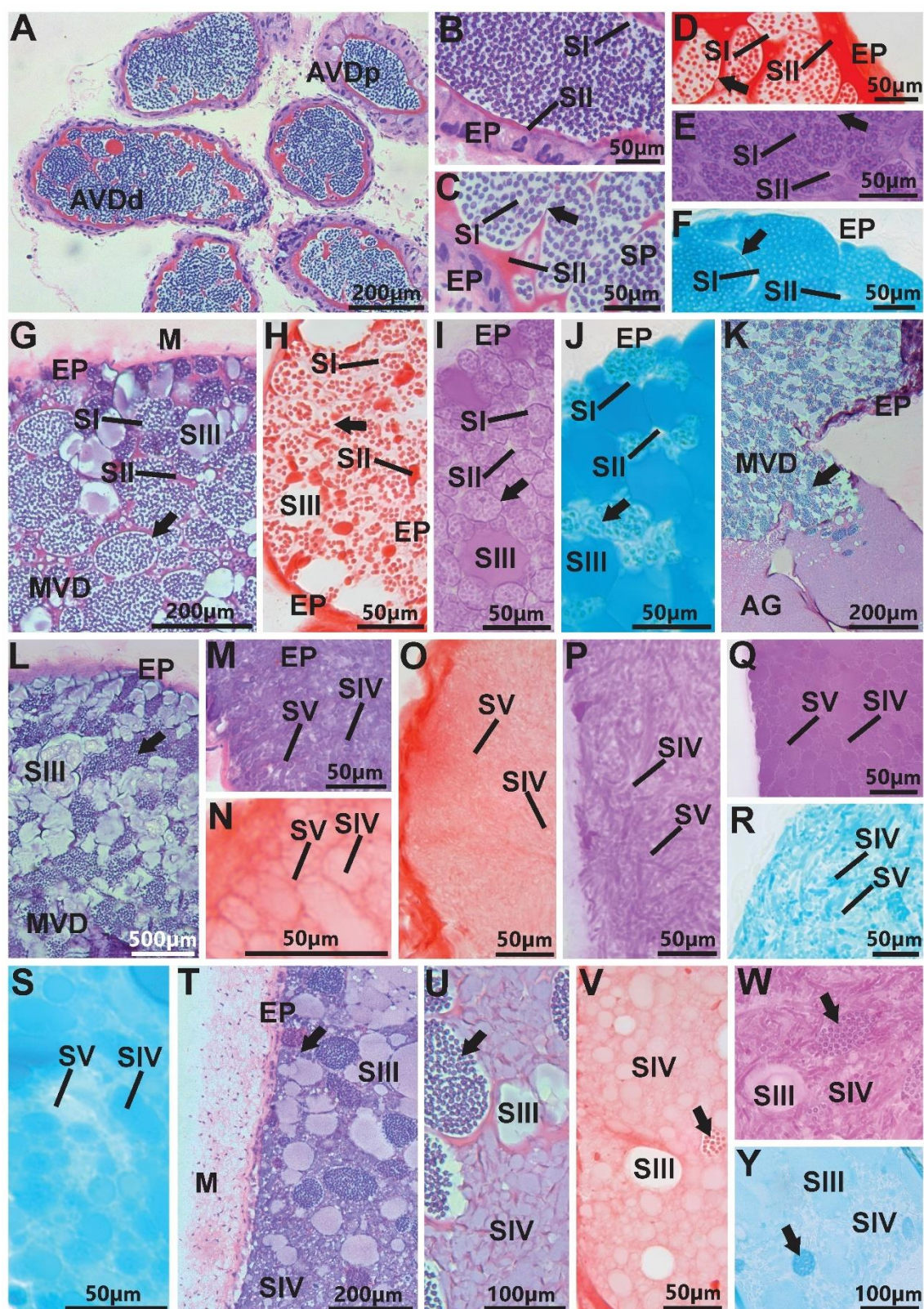


Figura 4. Histologia e histoquímica do vaso deferente e glândulas acessórias em Ocypodidae. **A.** Aspecto geral da AVDp, sem a presença de espermatóforos e AVDd com estes já formados por meio de secreção acidófila. Note o epitélio colunar simples. **B.** Detalhe da AVDp, mostrando a massa de espermatozoides imersos em SI e a SII no lúmen, junto ao ápice do epitélio. **C.** Detalhe da AVDd mostrando a parede dos espermatóforos (seta) e a SII acidófila. **D, E e F.** Histoquímicas da AVDd, evidenciando a SI fracamente reativa para proteínas e positiva aos polissacarídeos testados. A SII é fortemente positiva para proteínas e reativa aos polissacarídeos neutros e fracamente marcada aos polissacarídeos ácidos. A parede dos espermatóforos (seta) é fortemente positiva para proteínas e para os polissacarídeos testados. **G, H, I e J.** Detalhes da MVD, mostrando o epitélio pavimento recoberto por camada muscular mais espessa que a observada na região anterior. Nesta região do vaso ocorre a SIII, sem proteínas e intensamente marcada para polissacarídeos ácidos e neutros. A parede dos espermatóforos não mudou sua composição química (setas). **K e L.** Transição MVD/PVD na abertura dos túbulos das glândulas. Note os espermatóforos imersos em secreção na zona de transição (seta). **M, N, O, P, Q, R e S.** Detalhes das AG em coloração de rotina e histoquímica. A secreção SIV são grânulos acidófilos, proteicos e intensamente reativos para os dois tipos de polissacarídeos. A SIV em *U. cordatus* são pequenos grânulos e em *M. mordax* e *O. quadrata* são grandes grânulos esféricos. A SV intensamente marcada para todos os compostos é uma matriz fluida em *M. mordax* e *O. quadrata*, e fibrosa em *U. cordatus*. **T, U, V, W, Y.** Fluido seminal, sem alteração química na PVD mostrando mistura das secreções da AG e MVD. Poucos espermatóforos (setas) são observados e em **T**, nota-se a espessa musculatura desta região, assentada sob o epitélio pavimentoso. AG= glândulas acessórias; AVDd= região distal do vaso deferente anterior; AVDp= região proximal do vaso deferente anterior; EP= Epitélio; M= musculatura; MVD= vaso deferente médio; PVD= vaso deferente posterior; SI= secreção do tipo um; SII= secreção do tipo dois; SIII= secreção do tipo três; SIV= secreção do tipo quatro; SV= secreção do tipo cinco; A, B, C, G, L, M, O, P, U, Y= *Ucides cordatus*; D, E, F, K, R, T, W= *Ocypode quadrata*; I, J, N, Q, S, V= *Minuca mordax*. Colorações: HE= A, B, C, G, K, L, M, T, U; Xylidine ponceau= D, H, N, O, V; PAS= E, I, P, Q, W; azul de Alcian= F, J, R, S, Y.

Figura 5

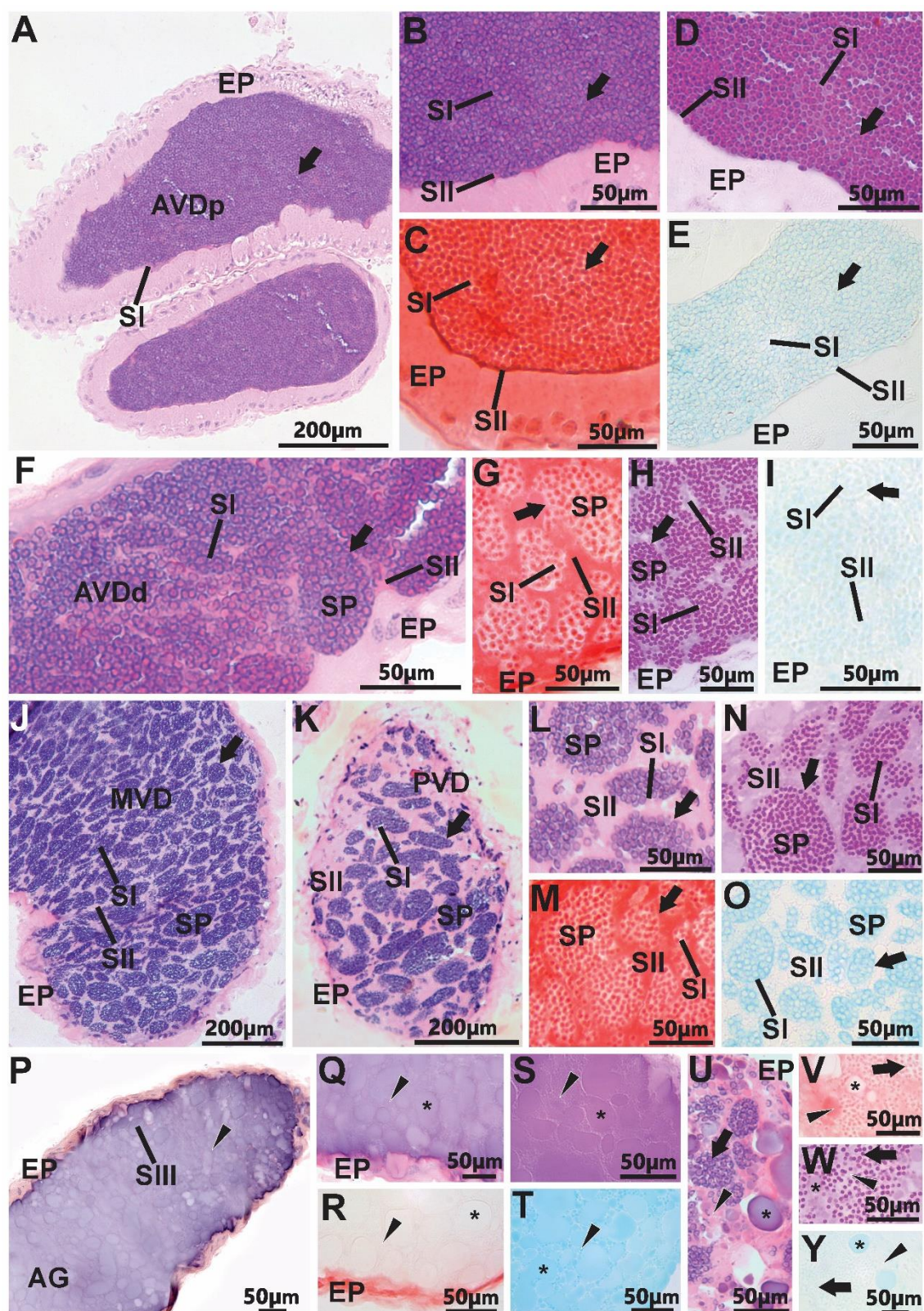


Figura 5. Caracterização do vaso deferente em glândulas em Varunidae **A.** AVDp mostrando o epitélio e a massa de espermatozoides imersos em SI acidófila. **B.** Detalhe da AVDp com espermatozoides (seta) misturados na secreção SI basófila, sendo a SII acidófila junto ao ápice do epitélio. **C, D e E.** Histoquímica da AVDp, preenchida por espermatozoides (seta) imersos em SI, a qual é positiva para proteínas e polissacarídeos neutros e ácidos. A SII é fortemente positiva para proteínas, reativa para polissacarídeos neutros e negativa para ácidos. **F, G, H e I.** AVDd mostrando os espermatozoides em SI acidófila, fracamente positiva para proteínas, polissacarídeos neutros e positiva para os ácidos, envolvidos pela delgada parede acidófila, glicoproteica, sem polissacarídeos ácidos (seta). A SII é acidófila fortemente positiva para proteínas, reativa aos polissacarídeos neutros e negativas para os ácidos. **J e K.** Aspecto geral da MVD e PVD, respectivamente. **L, M, N e O.** Detalhe das secreções e espermatóforos na MVD. A característica química dos espermatóforos e das secreções são as mesmas da AVD. A SI dentro dos espermatóforos é reativa a proteínas e polissacarídeos neutros e ácidos. A SII mais espessa, acidofílica e positiva para proteínas e polissacarídeos neutros e polissacarídeos ácidos. **P e Q.** Aspecto geral e detalhe das AG, respectivamente, mostrando o epitélio e a SIII formada por grânulos basófilos (*). Uma matriz basófila, SIV é notada entre a SIII (cabeça de seta). **R, S, T.** Os grânulos da SIII são levemente proteicos, fortemente positivos para polissacarídeos (*). A matriz SIV tem a mesma característica química dos grânulos de SIII (cabeças de seta). **U.** PVD após as glândulas mostrando a mistura das secreções SII da MVD (cabeça de seta) e a SIII das AG (*). **V, W, Y.** SII acidófila, positiva para proteínas e polissacarídeos neutros, sendo pouco reativa aos polissacarídeos ácidos. A SIII é basófila, sem reação para proteínas, e positiva para polissacarídeos. AG= glândulas acessórias; AVDd= região distal do vaso deferente anterior; AVDp= região proximal do vaso deferente anterior; EP= Epitélio; MVD= vaso deferente médio; PVD= vaso deferente posterior; SI= secreção do tipo um; SII= secreção do tipo dois; SIII= secreção do tipo três; SP= espermatóforos. Colorações: HE= A, B, F, J, K, L, P, Q, U; Xylidine= C, G, M, R, V; PAS= D, H, N, S, W; Azul de Alcian= E, I, O, T, Y.

Figure 6

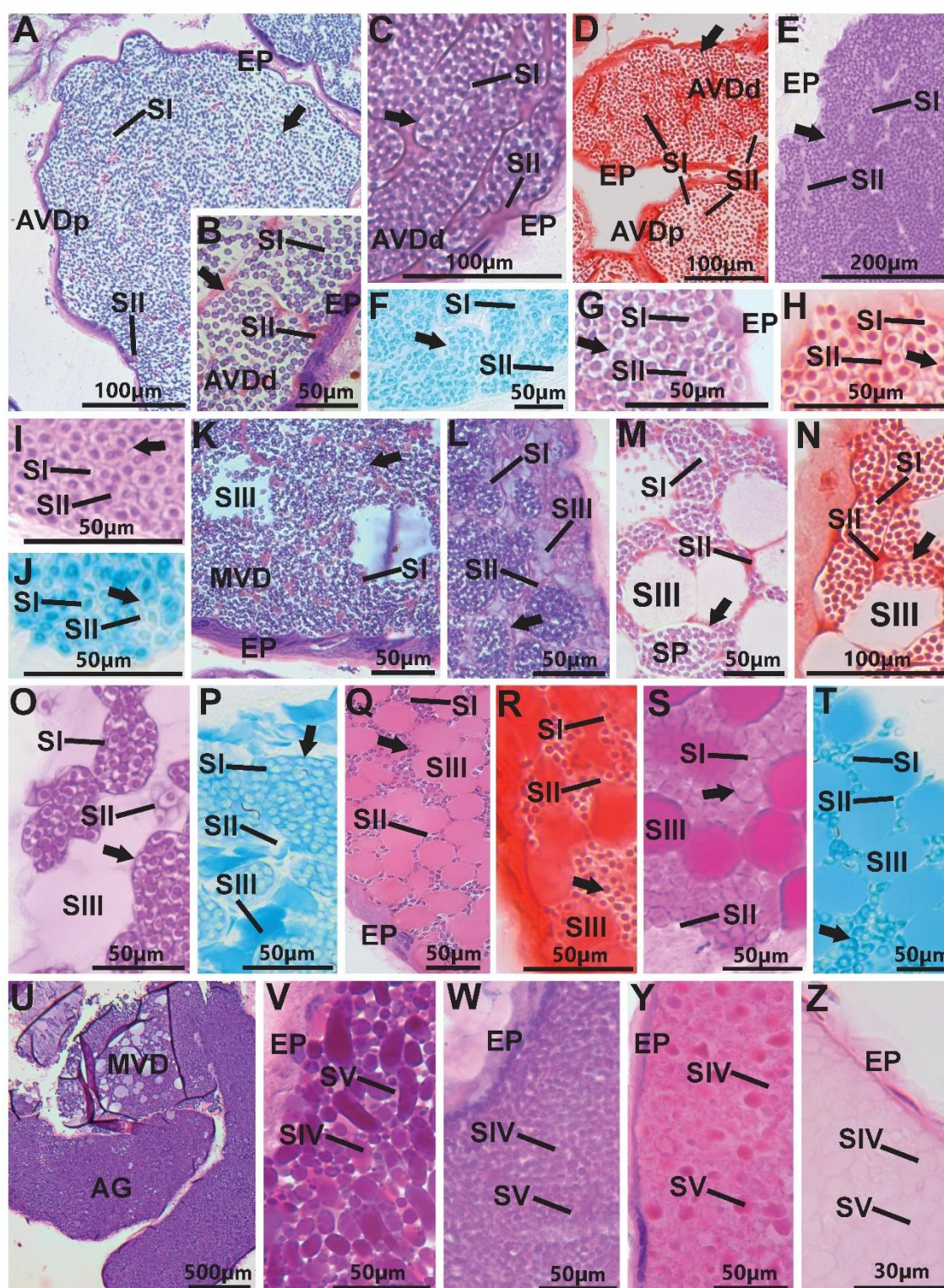


Figura 6. Histologia e histoquímica da AVD, MVD, AGC e PVD em Grapsidae. A.

AVDp com massa de espermatozoides (seta) imersa em SI fracamente basófila e SII acidófila na região periférica entre os espermatozoides. **B.** Detalhe da AVDd com a formação da parede dos espermatóforos (seta). **C.** Detalhe da AVDd com volumosa SII basófila e os espermatozoides envoltos pela parede do espermatóforo. **D, E e F.** Detalhe da AVDd com a SI levemente reativa para proteínas, positiva para polissacarídeos neutros e ácidos, respectivamente. A SII é intensamente corada para proteínas e fracamente positiva para polissacarídeos testados. A parede dos espermatóforos na AVDd (seta) tem a mesma característica da SII. **G, H, I e J.** Detalhe da AVD de *Pa. gracilis*, mostrando SI como área ao redor do espermatozoide nos espermatóforos cleistospérmicos. A SI não tem reação ao HE e o espermatozoide está corado (seta). A matriz SI tem pouca reatividade para proteína, mas é positiva para os dois polissacarídeos testados. A SII é fortemente positiva para proteínas e reativa para polissacarídeos neutros e parece ser negativa para polissacarídeos ácidos (setas). **K e L.** Detalhes da MVD em *Gr. grapsus* e *Go. cruentata*, respectivamente. Os epitélios são pavimentosos, com as camadas musculares algumas vezes maiores que o epitélio. A SI e SII mantem a mesma característica química. A SIII basófila é grande, com superfície sinuosa em *Gr. grapsus* e pequena, e muito numerosa em *Go. cruentata*. **M, N, O e P.** SIII esférica, acidófila e fracamente reativa para proteínas e polissacarídeos neutros nas espécies coenospérmicas. A SIII é intensamente marcada para polissacarídeos ácidos. A matriz de SI é fortemente positiva a polissacarídeos, junto aos espermatozoides (setas). **Q, R, S e T.** Detalhe da MVD com espermatóforos cleistospérmicos de *Pa. gracilis*. SI, ao redor do espermatozoide (seta) e a SII mantém as características químicas da AVD. A SIII, esférica e abundante, é acidófila e intensamente corada para todas as técnicas empregadas. **U.** Vista geral das AG em *G. lividus* na transição MVD/PVD. Note a secreção da MVD sendo misturada com a secreção da glândula. **V, W, Y e Z.** Em todas as espécies coenospérmicas, a SIV tem aspecto granular, sendo envoltos por SV. A SIV tem caráter basófilo, exceto para *Pa. transversus* que mostra acidofilia, acidófila, e em *Pa. gracilis* (Z), fracamente acidófila. A SV, matriz por entre os grânulos foi acidófila em todas as espécies. AG= glândulas acessórias; AVDd= região distal do vaso deferente anterior; AVDp= região proximal do vaso deferente anterior; EP= Epitélio; MVD= vaso deferente médio; PVD= vaso deferente posterior; PVDp= vaso deferente posterior (após as glândulas); SI= secreção do tipo um; SII= secreção do tipo dois; SIII= secreção do tipo três; SP= espermatóforos. Colorações: HE= A, B, C, G, K, L, M, Q, U, V, W, Y, Z;

Xylidine= D, H, N, R; PAS= E, I, O, S; Azul de Alcian= F, J, P, T. Micrografias: A, F, L= *Grapsus grapsus*; B, C, E, U, V= *Geograpsus lividus*; D, M, N, O, Y= *Pachygrapsus transversus*; K, P, S, W= *Goniopsis cruentata*; G, H, I, J, Q, R, S, T, Z= *Pachygrapsus gracilis*.

Figura 7

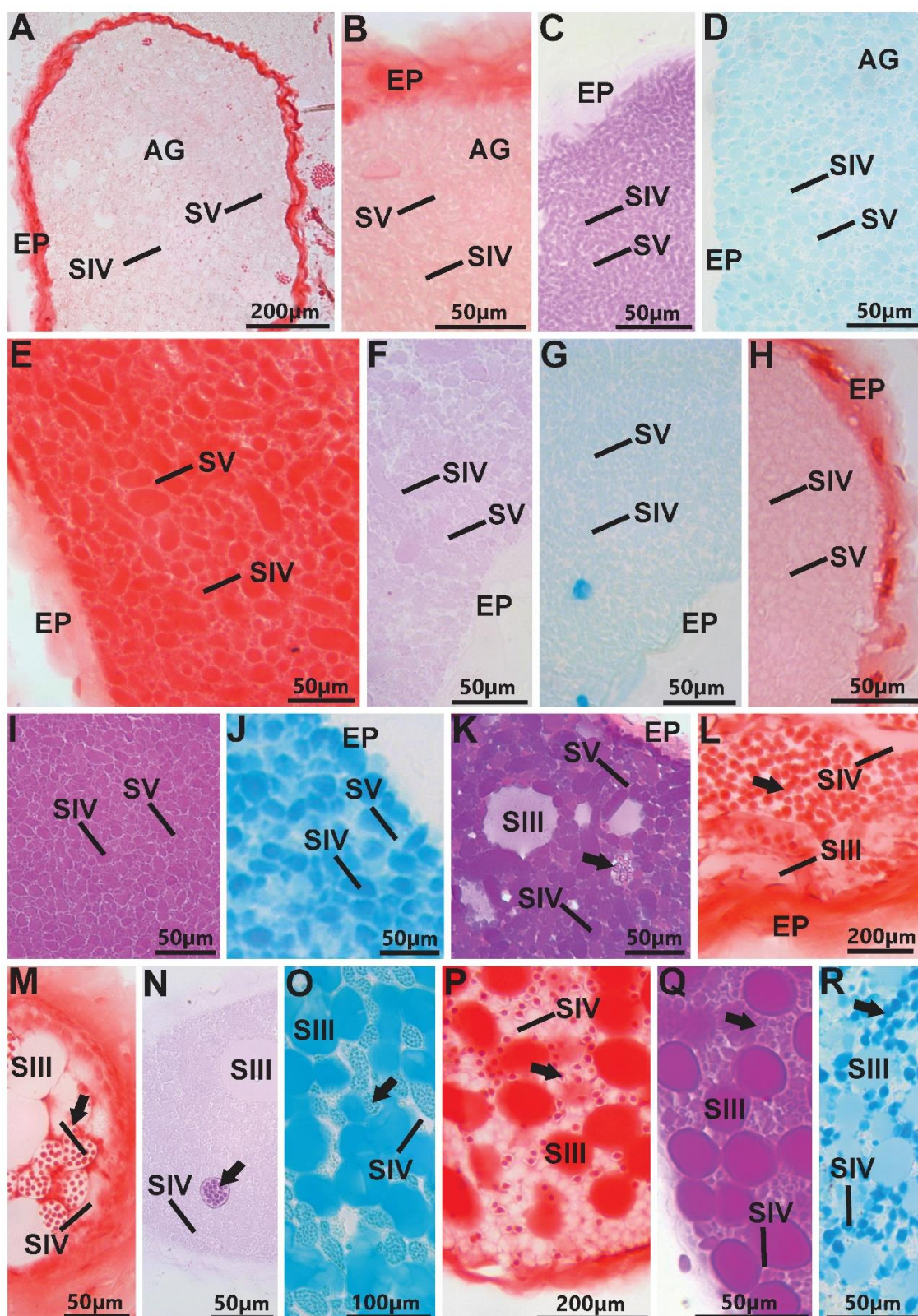


Figura 7. Histoquímica da AG, PVD e ducto ejaculatório em Grapsidae. A e B. Vista geral e detalhe das AG que tiveram como padrão a baixa reatividade para proteínas nos grânulos da SIV e matriz SV, em *G. lividus* e *Go cruentata*, respectivamente. **C e D.** Técnica para detecção de polissacarídeos neutros e ácidos, respectivamente, em *G. lividus*. Os grânulos da SIV foram reativos para os dois polissacarídeos. A SV foi fracamente positiva para todas as técnicas. **E, F e G.** *Pachygrapsus transversus* com a SIV apresentando intensa marcação para proteínas, e reação fracamente positiva para polissacarídeos neutros e ácidos na AG. A matriz SV e os grânulos foram positivos para Xylidine e fracamente marcados para os dois polissacarídeos. **H, I, J.** *Pachygrapsus gracilis*, AG com fraca reação para proteínas, e intensamente marcada para os dois tipos de polissacarídeos. **K e L.** Detalhe da PVD após a AG em *Gr. grapsus* e *Go. cruentata*, mostrando os espermátóforos (setas), as secreções glandulares, a SV, em predominância a secreção da MVD, SIII. Ao Xylidine ponceau, fica difícil separar qual é a SIII e SIV. **M, N, O P, Q e R.** Detalhe da PVD após a glândula em *Pa. transversus* (M, N e O) e *Pa. gracilis* (P, Q e R), exibindo SIII proveniente da MVD e SIV da AG, ambas misturadas e mostrando reação histoquímica opostas. Note a parede dos espermátóforos (setas) AG= glândulas acessórias; ED= ducto ejaculatório; EP= Epitélio; PVDp= vaso deferente posterior (após as glândulas); SII= secreção do tipo dois; SIII= secreção do tipo três; SIV= secreção do tipo quatro; Colorações: HE= K; Xylidine= A, B, E, H, L, M; PAS= C, F, I, N, Q; Azul de alcian= D, G, J, O, R. Micrografias: A, C, F, H, I, J= *Geograpsus lividus*;; L, P, Q= *Pachygrapsus transversus*; B, D, G, K= *Goniopsis cruentata*; E, M, N, O= *Pachygrapsus gracilis*.

Figura 8

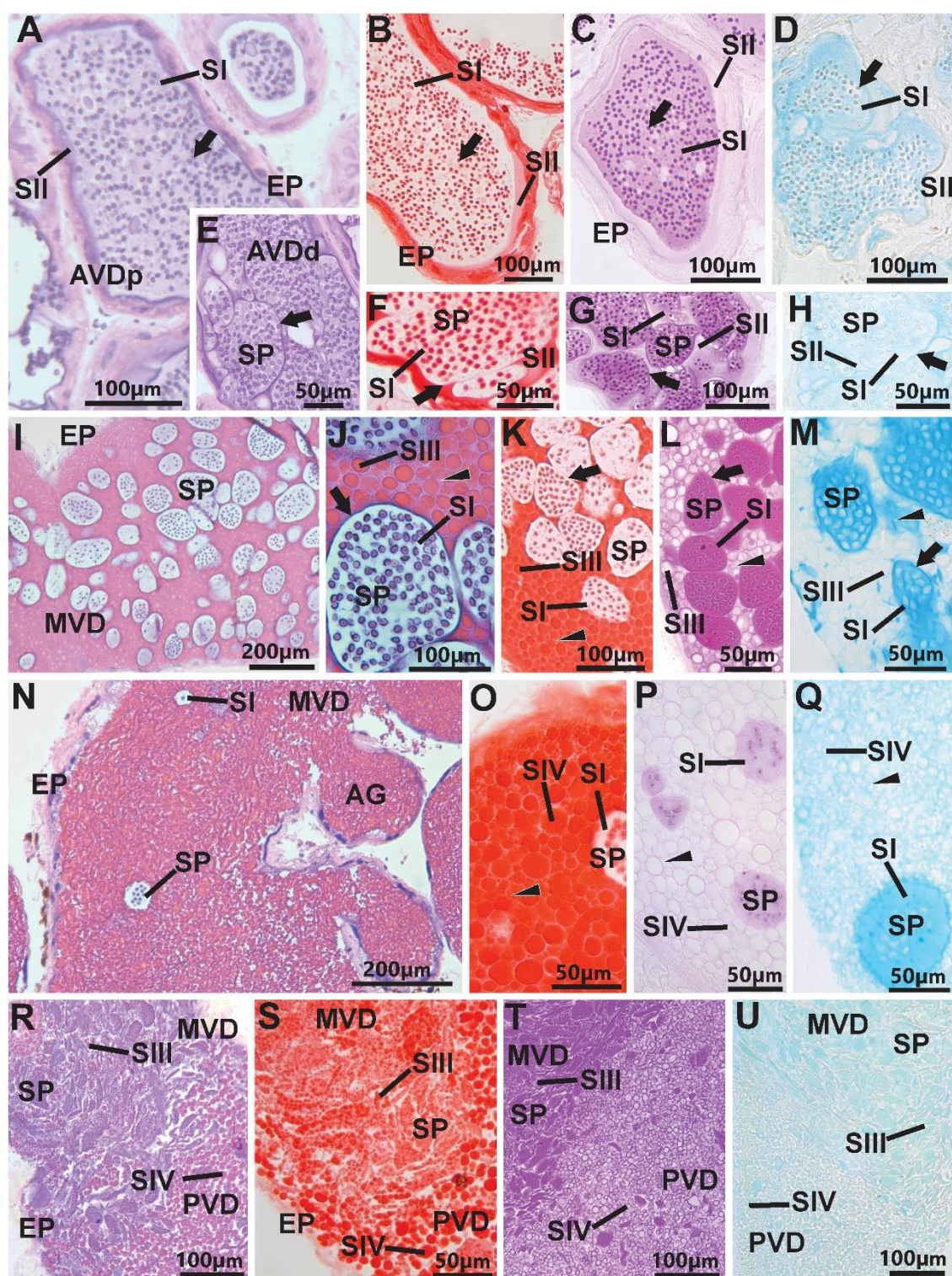


Figura 8. Caracterização do vaso deferente e AG em Sesarmidae. A. AVDp apresenta epitélio cúbico simples. Espermatozoides livres (seta) imersos em SI basófila. **B, C e D.** Histoquímica da AVDp. SI pouco reativa para proteínas entre os espermatozoides (seta). Na periferia do vaso ocorre a SII positiva para proteínas. A SI é positiva para polissacarídeos neutros e ácidos, sendo a SII fracamente positiva e negativa para os mesmos polissacarídeos. **E, F, G e H.** AVDd com os espermatóforos formados. A SII é fortemente reativa para proteínas, positiva para polissacarídeos neutros, e negativa para os ácidos. A SI não sofre alteração química desde AVDp. Note a características glicoproteica das paredes dos espermatóforos (setas). **I, J, K, L, M.** Aspecto geral da MVD apresentando espermatóforos com espermatozoides imersos em secreção SI. No detalhe em J, identifica-se as SIII e SII muito acidófilas entremeadas por SII (cabeça de seta). A SIII é um grânulo perfeitamente circular, extremamente positivo para proteínas. A SII mantém a mesma característica química observada na AVD. A SI, no interior dos espermatóforos, é fortemente reativa para os dois tipos polissacarídeos testados. **N.** Abertura das AG na transição entre a MVD e a PVD. Cada glândula abre-se de maneira independente, uma ao lado da outra liberando grande quantidade de secreção. O material da MVD fica parcialmente separado da PVD. A secreção das AG são grânulos acidófilos. **O, P, Q.** Detalhe das secreções da AG. Nas regiões mais próximas da abertura, é observado alguns espermatóforos invadindo as AG. A SIV é granular, fortemente positiva ao Xylidine ponceau e apresenta maior tamanho que os grânulos de SIII. A SIII exibe intensa marcação cortical para polissacarídeos neutros, sendo a medula positiva ao PAS, enquanto a SV (cabeça de seta) é fracamente positiva ao PAS e positiva para os polissacarídeos ácidos. **R, S, T, U.** Microfotografias mostrando a pouca mistura entre as secreções da MVD, com os espermatóforos e grânulos da SIII menores que os SIV, preenchendo os espaços da PVD. Pode-se observar poucos espermatóforos distantes uns dos outros nesta região. AG= glândulas acessórias; ; AVDd= região distal do vaso deferente anterior; AVDp= região proximal do vaso deferente anterior; EP= Epitélio; MVD= vaso deferente médio; PVD= vaso deferente posterior; SI= secreção do tipo um; SII= secreção do tipo dois; SIII= secreção do tipo três; SIV secreção do tipo quatro; SV secreção do tipo V; SP= espermatóforos. Colorações: HE= A, E, I, J, N, R. Xylidine= B, F, K, O, S; PAS= C, G, L, P, T; Azul de Alcian= D, H, M, Q, U. Micrografias: A – H, R= *Sesarma rectum*; I, K, L e M= *Armases rubripes* representando *A. pisonii* e *S. rectum*; N, J, O, P, Q= *Armases angustipes*; R – U= *Aratus pisonii*.

Figura 9

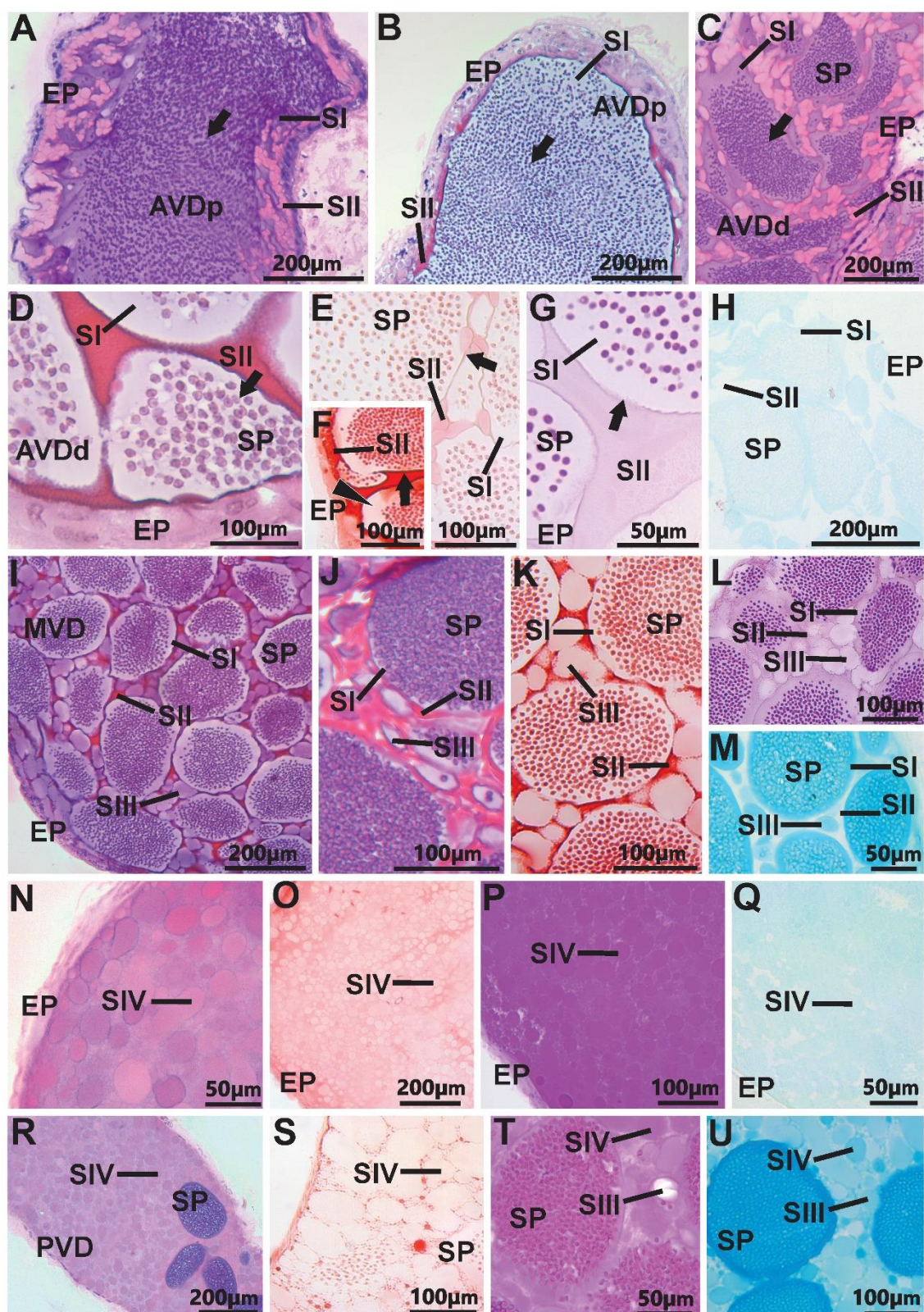


Figura 9. Histologia e histoquímica do vaso deferente e glândulas em Gecarcinidae.

A e B. Aspecto geral da AVDp em *C. guanhumi* e *J. lagostoma*, respectivamente. As massas de espermatozoides (seta) estão imersas em SI basófila, circundada pela SII acidófila, muito abundante e coagulada em *C. guanhumi*. **C, D.** Montagem dos espermatóforos (seta) na AVDd pela ação da SII separando a SI. **E, F, G e H.** Histoquímica da AVD com as secreções SI fracamente positivas para proteínas e positivas para polissacarídeos no interior dos espermatóforos (setas). A SII foi positiva para todos os compostos, porém em *J. lagostoma* (F) ela é fortemente positiva para proteínas. **I e J.** Aspecto geral da MVD com a presença de SIII sob a forma de grânulos basófilos pequenos, sendo menores em *J. lagostoma* (J). **K, L e M.** A SIII é fracamente positiva para proteínas e polissacarídeos neutros, sendo intensamente reativa para os polissacarídeos ácidos. **N, O, P, Q.** Detalhes da AG que se abrem na transição MVD/PVD, mostrando a SIV formada por grânulos esféricos, acidófilos, fracamente reativos para proteínas, positivos para polissacarídeos ácidos e intensamente corados para os polissacarídeos neutros. **R, S, T e U.** Aspecto geral da PVD após a mistura das secreções da AG e da MVD. As características histoquímicas não são alteradas, porém existe preponderância da secreção glandular em relação a da MVD. A SIII e SIV são indistinguíveis ao Xylidine ponceau. Nota-se ainda que na PVD ocorrem poucos espermatóforos, distantes entre si. AG= glândulas acessórias; AVDd= região distal do vaso deferente anterior; AVDp= região proximal do vaso deferente anterior; EP= Epitélio; MVD= vaso deferente médio; PVD= vaso deferente posterior; SI= secreção do tipo um; SII= secreção do tipo dois; SIII= secreção do tipo três; SIV= secreção do tipo quatro; SP= espermatóforos. Colorações: HE= A, B, C, D, I, J, N, R; Xylidine ponceau= E, F, K, O, S; PAS= G, L, P, T; Azul de Alcian= H, M, Q, U. Micrografias: A, C, E, H, J, M, N, P, R, T= *Cardisoma guanhumi*; B, D, F, G, I, K, L, O, Q, S = *Johnngarthia lagostoma*.

Figura 10

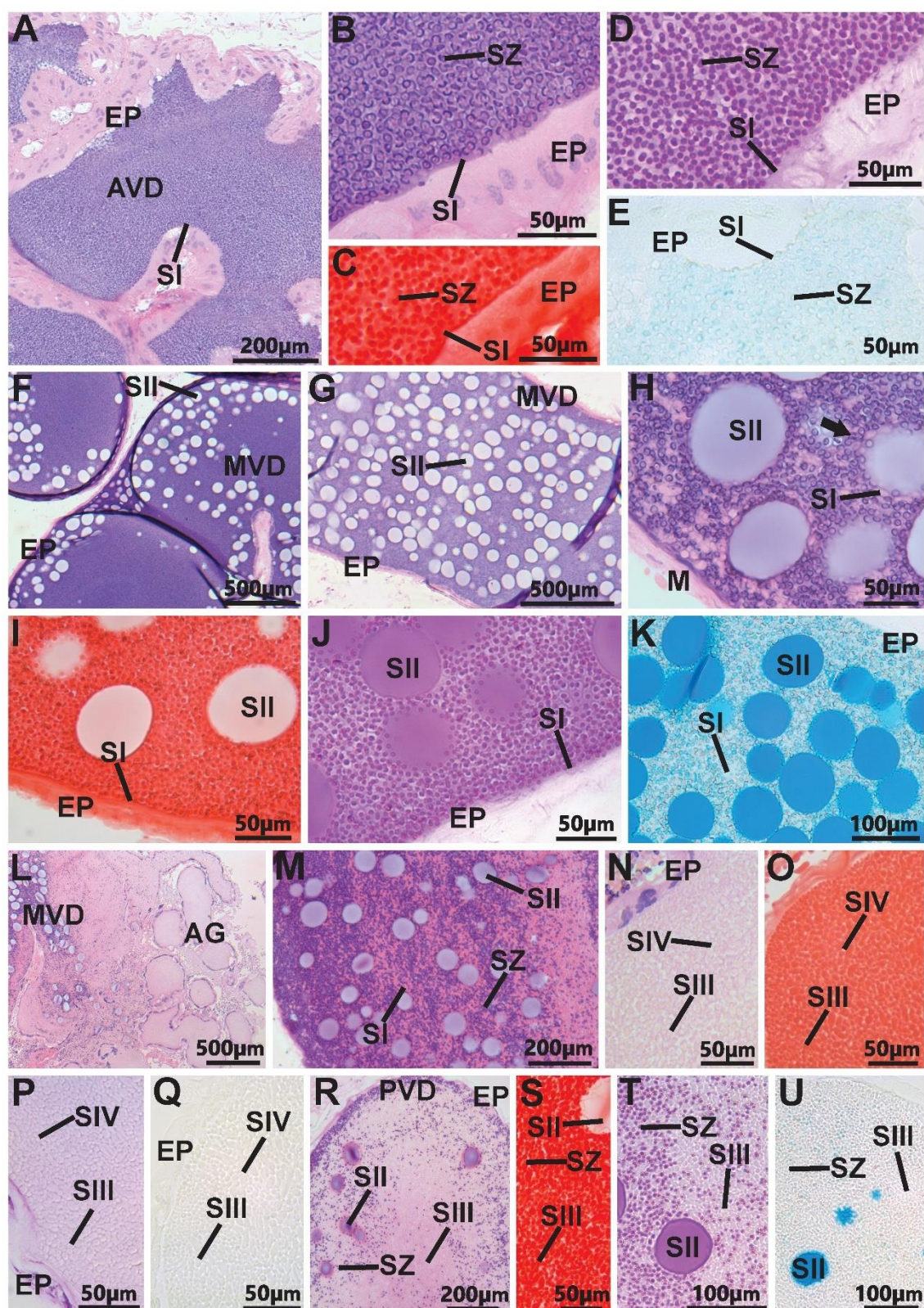


Figura 10. Vaso deferente e glândulas do Plagusiidae *Plagusia depressa*. A e B.

Aspecto geral da AVD, mostrando o epitélio colunar simples com citoplasma acidófilo. Os espermatozoides formam uma grande massa espermática, separados por SI. Ao redor dos espermatozoides não é possível detectar uma outra secreção. **C, D e E.** Histoquímica da AVD, com SI intensamente reativa para proteínas e positiva para polissacarídeos neutros e ácidos. **F, G e H.** Vistas gerais e detalhe (H) da MVD com a SI acidófila, por entre os espermatozoides não estruturados em espermatóforos coenospérmicos (seta). Na MVD ocorre a SII, basófila, dispostas em forma grandes grânulos. **I, J, K.** Detalhes da histoquímica da MVD, com a SI mantendo sua característica química fortemente reativa para proteínas e positiva aos polissacarídeos testados. A SII basófila é fracamente proteica, porém muito reativa aos polissacarídeos **L, M, N.** Aspecto geral e detalhes (M e N) da abertura das AG na transição MVD e PVD, mostrando a mistura de secreção glandular com o fluido seminal proveniente da MVD. As glândulas abrem-se na mesma altura, porém de forma independente, formando uma coroa neste local. **O, P, Q.** Detalhes das AG para as diferentes técnicas histoquímicas. A secreção SIII é granular, porém os grânulos são muito pequenos, fortemente proteicos, e pouco reativos à polissacarídeos neutros e negativos à polissacarídeos ácidos. Por entre eles, uma delgada matriz preenche os espaços entre os grânulos, a SIV, sendo positiva para proteínas, fracamente positiva ao PAS e negativa ao azul de Alcian. **R.** Aspecto geral da PVD após a mistura dos conteúdos do vaso deferente e AG. Nota-se o epitélio pavimentoso simples e no lúmen, amplo, está a SII e SIII, por entre os espermatozoides em cleistospermia. A SI não foi detectada. **S, T, U.** Detalhes da PVD após a mistura dos fluidos seminais, com as secreções mantendo a característica química. Nota-se uma predominância de secreção glandular SIII fortemente proteica e fracamente positiva para polissacarídeos neutros e negativa a polissacarídeos ácidos nesta região. AG= glândulas acessórias; AVD= vaso deferente anterior; EP= Epitélio; M= Camada muscular; MVD= vaso deferente médio; PVD= vaso deferente posterior; SI= secreção do tipo um; SII= secreção do tipo dois; SIII= secreção do tipo três; SIV= secreção tipo quatro; SZ= espermatozoide. Colorações: HE= A, B, F, G, H, L, M, N, R; Xylidine= C, I, O, S; PAS= D, J, P, T; Azul de Alcian= E, K, Q, U.

Figura 11

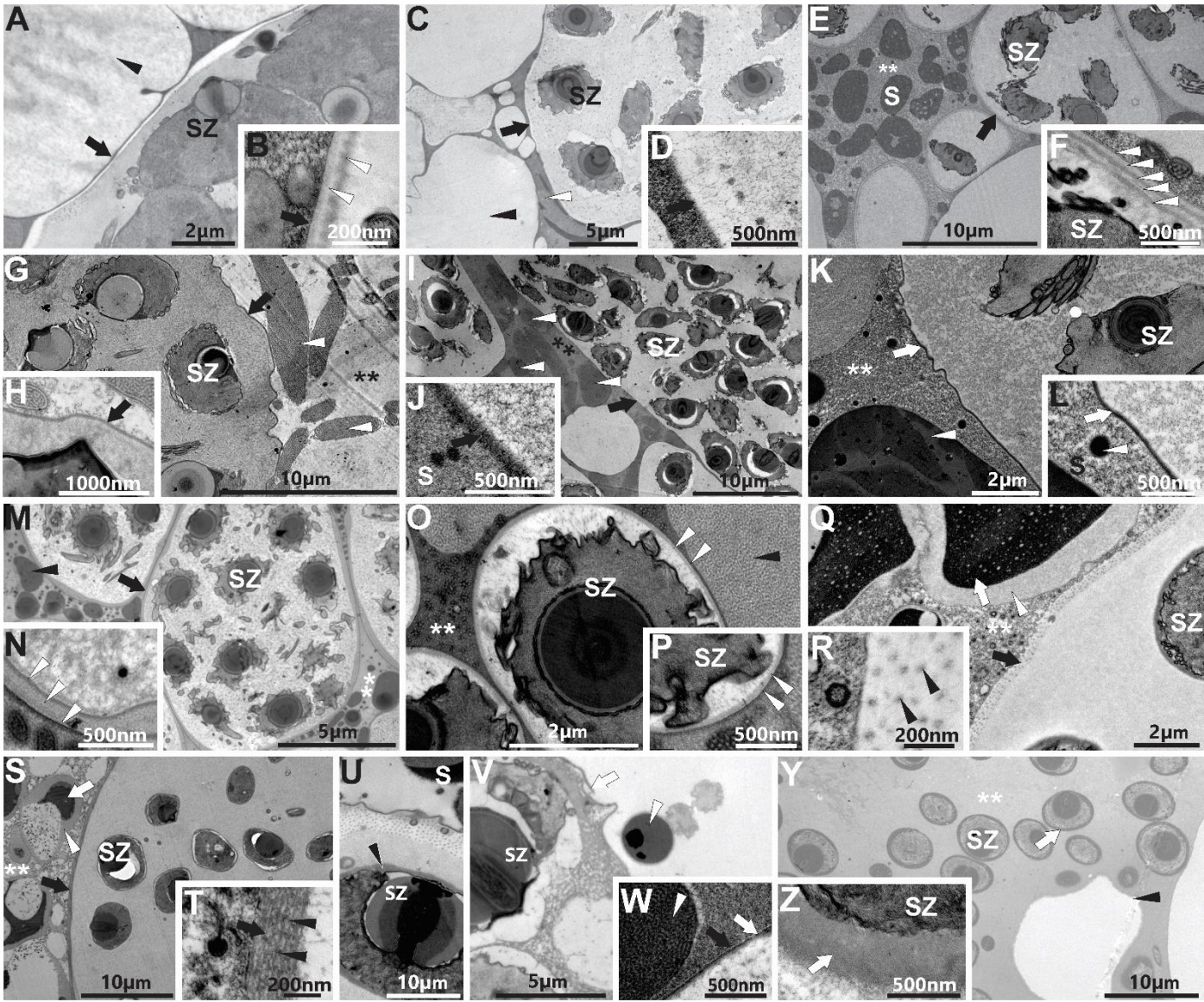


Figura 11. Ultraestrutura dos espermatóforos e fluido seminal para Thoracotremata. **A, B.** Vista geral e detalhe (B) dos espermatóforos e fluido seminal de *A. patagoniensis* e *D. crinitichelis*, respectivamente. Note a parede delgada e lisa (seta), composta por três camadas com aspecto trilaminar (cabeças de seta branca). Note os espermatóforos envoltos por matriz eletrodensa, onde estão imersos grânulos menos eletrodensos (cabeça de seta preta). **C, D.** Espermatóforos imersos em matriz (cabeça de seta branca) com secreção granular (cabeça de seta preta) em *Ocypode quadrata*. A parede dos espermatóforos (seta) é mais eletrodensa que as secreções do lúmen. **E, F.** Aspecto geral e detalhe da secreção luminal do vaso deferente e parede dos espermatóforos em *M. mordax*. Observe em (E) os espermatóforos imersos na matriz (**) finamente granular e homogênea, com a presença de grânulos eletrodensos e parede dos espermatóforos (F) com cinco camadas (cabeças de seta). **G, H.** Vaso deferente e espermatóforos (seta) de *U. cordatus*. Note ao redor dos espermatóforos com delgada parede ondulada e eletrodensa, a matriz (**) menos eletrodensa, composta por grânulos eletrodensos de diferentes tamanhos (cabeças de seta). **I e J.** Aspecto geral do vaso deferente de *C. integer* representando o padrão observado em *N. granulata* e *Cyr. angulatus*. Os espermatóforos (seta) com película eletrodensa, imersos em matriz (**) granular (cabeças de seta). **K, L.** Espermatóforos de *Gr. grapsus*, representando *G. lividus* e *Go. cruentata*, imersos em secreção finamente eletrodensa (**) e granular (cabeças de seta). Em (L) note a parede com película delgada e ondulada (seta). **M, N, O, P.** Aspecto geral da secreção do vaso deferente em *Pachygrapsus* (M, O) e detalhes da parede dos espermatóforos (N, P). Note os espermatóforos coenospérmicos (M, N) de *Pa. transversus* (seta), com parede formada por três camadas de secreção (cabeças de seta), enquanto *Pa. gracilis* (O, P) é formada por duas camadas de secreção. **Q, R, S, T.** Aspecto geral do fluido seminal em Sesamidae (Q, R), exibindo fluido seminal com medula eletrodensa (seta branca) e córtex menos eletrodensa (cabeça de seta branca). O detalhe da parede dos espermatóforos (seta preta) de *Ar. rubripes* (R), representando o padrão observado em *Ar. angustipes* mostra parede espessa e levemente ondulada, composta por canalículos eletrodensos (cabeças de seta preta). Detalhe da parede de *S. rectum* (T), representando *A. pisonii*, com canalículos de aspecto estriado (cabeças de seta preta). **U.** Espermatozoide de *Ar. angustipes* mostrando a camada de material eletrodensa (cabeça de seta) que envolve cada espermatozoide de todos os sesarmídeos. **V, W.** Fluido seminal e espermatóforos de *J. lagostoma*, representando o padrão observado em *C. guanhumí*. Note a parede delgada e ondulada com duas películas de secreção: uma

eletrodensa (seta branca) e outra menos eletrodensa (seta preta). Note o fluido seminal eletrodenso e granular ao redor do espermatóforo (cabeça de seta preta). **Y, Z.** Aspecto geral do fluido seminal e detalhe da parede dos espermatóforos de *P. depressa*. A matriz (**) que envolve os espermatozoides cleistospérmicos é homogênea e eletrodensa, com a presença de grânulos pouco eletrodenso e córtex de diferentes tamanhos (cabeça de seta). A parede é espessa, lisa e eletrodensa (seta). SZ= espermatozoides;

Figura 12

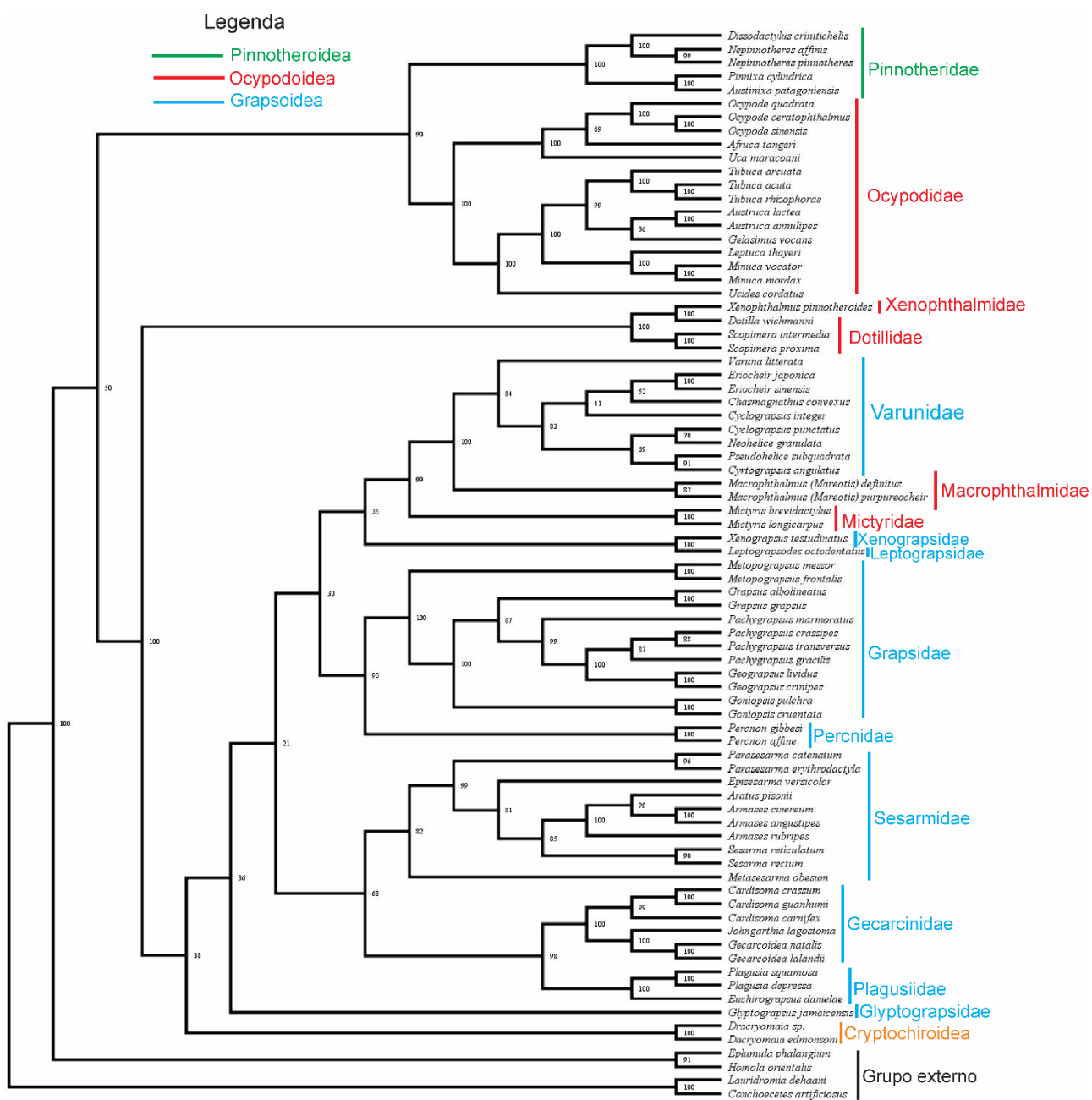


Figura 12. Análise filogenética das famílias de Thoracotremata, com base em análise por máxima verossimilhança (ML).

Discussão

Neste capítulo foi apresentada a análise comparativa do SRM para as principais espécies da costa brasileira, com o intuito de propor pela primeira vez uma padronização da descrição do SRM para Thoracotremata. Devido às dificuldades de logística e coleta dos animais, não foi possível a inclusão de todas as espécies brasileiras, mas aqui está uma linha de base para estudos futuros. Por meio dos resultados, foi possível verificar que a principal plesiomorfia anatômica e histológica de Thoracotremata é a presença de AG, a qual está disposta na área de transição entre a MVD e PVD. Diversos autores afirmaram que estas glândulas são parte integrante da PVD, ou que fazem parte da transição para o ducto ejaculatório (Sudhadevi & Adiyodi, 1995; Nicolau et al., 2012; Becker et al., 2013). Outros autores nomearam as AG como PVD, as quais terminam no ducto ejaculatório (Shinozaki-Mendes et al., 2017). Estas proposições não parecem ser corretas, uma vez que a secreção da MVD, cuja característica, sempre foi tipicamente granular e compartilhada por todas as famílias, exceto Varunidae (provável apomorfia), é alterada por uma estrutura anatômica, a AGC. Essas estruturas, liberam suas secreções no fluido seminal do vaso deferente, produzindo um novo composto misto, além da alteração da estrutura epitelial pela desembocadura das glândulas. Somado a isso, o ducto ejaculatório tem muitas camadas musculares e normalmente está quase todo interno aos gonópodos I, sendo retirado dos caranguejos durante as disseções, mais facilmente em animais pequenos como Pinnotheridae. Estes argumentos parecem suficientemente robustos para suportar a padronização de AVD (comumente, exibindo duas porções: AVDp e AVDd), longa MVD, AG abrindo na transição MVD/PVD, PVD e ducto ejaculatórios. Esta proposta então concorda com outros estudos prévios realizados para Thoracotremata (Garcia & Silva, 2006; Castilho et al., 2008; Santos et al., 2009, Ganapiriaya et al., 2017). Tiseo et al. (2014) também seguem esta descrição, apesar do diagrama apresentado pelos autores mostram a PVD posicionada antes da AG.

Outros importantes aspectos do SRM em diferentes espécies de Thoracotremata quando aliados à análise filogenética molecular foram utilizados para auxiliar no entendimento das relações evolutivas entre suas famílias. A análise morfológica do sistema reprodutor dos Thoracotremata do presente estudo em adição aos da literatura (Tabela 1), demonstrou que todos os táxons do grupo compartilham a presença de um sistema reprodutor formado por um órgão bilateral, em forma de “H”, constituído por um par de testículos e um par de vasa deferentia. Este padrão é tipicamente observado em Brachyura (Johnson, 1980; Garcia & Silva, 2006; Castilho et al., 2008; Santos et al., 2009;

Nicolau et al., 2012; Zara et al., 2012; Becker et al., 2013; Tiseo et al., 2014; Garcia Bento et al., 2019). Entretanto, as análises indicaram que os caranguejos Thoracotremata, além da AG, podem compartilhar as seguintes características: testículo histologicamente classificado como do tipo tubular e espermatóforos coenospérmicos.

O testículo em Pinnotheroidea, Grapsoidea e Ocypodoidea aqui estudados, foi classificado como do tipo tubular, seguindo o padrão proposto por Nagao & Munehara (2003). Porém, as secções testiculares não mostraram estágios de células sequenciais (de espermatócitos a espermátides) em um mesmo túbulo, conforme observado por Simeó et al. (2009) em *M. brachydactyla*. Em Thoracotremata, os espermatozoides maduros são liberados na região de evacuação ou túbulo seminífero (túbulo coletor), seguindo o mesmo padrão observado em outros testículos do tipo tubular (Simeó et al., 2009; Tiseo et al., 2014). A espermatogênese, caracterizada pela presença de espermatogônias e espermatócitos em diferentes estágios, assim como as diferentes fases de maturação das espermátides, que correspondem à espermiogênese, mostraram características histológicas semelhantes às registradas em outras espécies de caranguejos, sugerindo ser padrão típico geral de Brachyura (Ryan, 1967; Garcia e Silva, 2006; Castilho et al., 2008; Santos et al., 2009; Zara et al., 2012; Tiseo et al., 2014).

Em relação ao vaso deferente, em todas as espécies analisadas, com exceção à *Pa. gracilis*, foi possível observar a clara diferenciação das regiões do vaso deferente, tais como região anterior (com as porções proximal e distal), média e posterior. Na literatura, é comum encontrar caranguejos exibindo estas principais regiões. Porém, a nomenclatura utilizada para classificá-las varia consideravelmente, especialmente entre as diferentes famílias de Thoracotremata (para revisão ver Krol et al., 1992; Garcia & Silva, 2006; Castilho et al., 2008; Santos et al., 2009; Nicolau et al., 2012; Becker et al., 2013). Em Ocypodoidea, por exemplo, essas mesmas regiões foram classificadas em *U. cordatus* como proximal, medial e distal (Castilho et al., 2008). Por sua vez, no Grapsoidea *Go. cruentata*, o vaso deferente foi descrito como sendo formado pelas expansões e pelo vaso deferente mais posterior (Garcia & Silva, 2006). Para padronizar a denominação das diferentes regiões do vaso deferente, este trabalho concorda com a proposição de Tiseo et al. (2014), em utilizar os termos vaso deferente anterior, médio e posterior para classificar as regiões do vaso deferente em Brachyura.

A morfologia macroscópica das glândulas acessórias varia bastante entre as diferentes espécies estudadas, no entanto, é possível observar padrões similares entre indivíduos da mesma família, com poucas diferenças sendo observadas. Em algumas

espécies de Grapsidae, Sesarmidae, e no Ocypodidae *Ucides cordatus*, as AG apresentam ramos tubulares curtos, como também foi anteriormente descrito para os grapsídeos *Pa. gracilis* e *Pa. transversus* (Tiseo et al., 2014) e para o sesarmídeo *Par. plicatum* (Ganapiriya et al., 2017). Em outras espécies, como no Pinnotheridae *A. patagoniensis*, no Varunidae *C. integer*, no Gecarcinidae *J. lagostoma* e no Plagusiidae *P. depressa*, as glândulas têm tamanhos intermediários. No entanto, as glândulas acessórias do plagusiídeo possuem superfície enrugada, ao contrário das superfícies lisas, observadas nas demais espécies, podendo ser uma provável apomorfia da espécie. Em *C. guanhumi*, diferente do padrão encontrado para as outras espécies deste estudo, as glândulas são mais volumosas e alongadas, com a presença de ramos terminais. Segundo Becker et al. (2013), as glândulas acessórias nos pinoterídeos *P. pisum* e *N. pinnotheres* apresentam morfologia similar à descrita para *Go. cruentata* e *C. guanhumi*, porém, são maiores em tamanho quando comparadas com a morfologia corpórea destes animais. A comparação anatômica das glândulas acessórias entre os táxons mostra que Pinnotheridae possui glândulas sem anastomose e muito volumosas, similares ao padrão registrado para Grapsidae, as quais são ligeiramente delgadas e terminam em fundo cego. Por outro lado, observa-se uma diferença marcante nas glândulas encontradas em *C. guanhumi*. Nessa espécie, as glândulas são alongadas e possuem ramificações terminais curtas, que são distintas das glândulas volumosas e sem anastomose encontradas em Pinnotheridae e Grapsidae. Essas diferenças anatômicas nas glândulas acessórias entre os táxons destacam a variabilidade existente na morfologia das glândulas em diferentes espécies e famílias.

As glândulas acessórias que se abrem na transição da MVD e marcam o início da PVD, receberam distintos nomes em estudos realizados ao decorrer dos anos, aumentando a confusão anatômica. As AG foram nominadas como expansões em *Go. cruentata* (Garcia & Silva, 2006), evaginações em *U. cordatus* (Castilho et al., 2008), *Ar. rubripes* (Santos et al., 2009) e *A. pisonii* (Nicolau et al., 2012) e apêndices em representantes de Pinnotheridae (Becker et al., 2013). Em Hartnoll (1965), as glândulas acessórias de *A. pisonii* foram também classificadas como divertículos. Todos estes termos podem ser considerados sinônimos, fazendo-se necessário a padronização dos termos na literatura científica especializada. Porém, as AG jamais podem ser chamadas de PVD, como foi descrito em *C. guanhumi* (Shinozaki-Mendes et al., 2012). Histologicamente, o termo glândula acessória é comumente utilizado para descrever aglomerados de células epiteliais glandulares maiores e mais complexas. Essas estruturas são sempre formadas a

partir de epitélios de revestimento, cujas células se multiplicam e se infiltram no tecido conjuntivo subjacente, antes de sofrerem diferenciação. Adicionalmente, estas glândulas podem ser classificadas como exócrinas quando mantêm uma conexão com o epitélio original por meio de ductos tubulares, os quais são compostos por células epiteliais. É por meio desses ductos que as secreções glandulares são eliminadas, alcançando a superfície do corpo ou da cavidade correspondente (para revisão, Junqueira & Carneiro, 2017; Ross & Pawlina, 2019). A classificação proposta por Tiseo et al. (2014), que considera o termo "glândulas acessórias" mais adequado para descrever as estruturas em Grapsoidea, é aplicável não apenas aos representantes desta superfamília, mas também a todos os Thoracotremata. Essa terminologia é preferível porque as glândulas nas espécies de Thoracotremata analisadas mantêm conexão com o epitélio de origem, produzem secreção por mecanismo merócrino e mostra as mesmas características descritas na Histologia Básica por Junqueira & Carneiro (2017).

Em todas as espécies, com exceção à *P. depressa* e *Pa. gracilis*, o fluido seminal produzido na região anterior do vaso deferente possibilitou a formação dos espermatóforos coenospérmicos (vários espermatozoides por espermatóforos), caracterizando a presença da AVD distal, como também observado em outros Pinnotheroidea, Grapsoidea e Ocypodoidea (Castilho et al., 2008; Santos et al., 2009; Nicolau et al., 2012; Becker et al., 2013; Tiseo et al., 2014). Porém, em *P. depressa* e *Pa. gracilis*, a AVD não foi dividida em AVDp e AVDd, uma vez que nesta região não foi observada alterações no fluido seminal e os espermatóforos mostraram-se preferencialmente do tipo cleistospérmicos, com a presença de um espermatozoide por espermatóforo, sendo consideradas como as principais apomorfias das espécies. Durante as análises ultraestruturais deste estudo, foi possível observar ao menos um espermatóforo com a presença de dois espermatozoides em seu interior. Tiseo et al. (2014) já haviam descrito a presença de espermatóforos cleistospérmicos em *Pa. gracilis*, sendo que esta era a única espécie de Thoracotremata até o momento a apresentar este tipo de empacotamento dos espermatozoides, o qual é mais comum em caranguejos de água doce (Guinot et al., 1997; Klaus et al., 2009; Klaus & Brandis, 2011). A presença de espermatóforos cleistospérmicos em representantes de água doce seria uma estratégia para evitar a polispermia em indivíduos que apresentam grandes e poucos ovos (Guinot et al., 1997). Porém, essa proposição foi descartada para *Pa. gracilis*, uma vez que esta espécie pode possuir ovos com tamanho similar ou menores em comparação com *Pa. transversus*, o qual apresenta espermatóforos coenospérmicos (Hartnoll, 1965; Tiseo et

al., 2014, 2017). Alguns autores sugerem que a presença de espermatóforos cleistospérmicos pode estar relacionada ao processo de deiscência dessas estruturas, possivelmente devido à acidez do fluido seminal. Essa hipótese é suportada por estudos como os de Beninger et al. (1993), Klaus et al. (2009) e Tiseo et al. (2014), que indicam uma associação entre a acidez do fluido seminal e a ocorrência de espermatóforos cleistospérmicos.

Nas regiões mais posteriores do vaso deferente e glândulas acessórias, observa-se a produção de grande quantidade de fluido seminal. Nas espécies deste estudo, o fluido seminal é, em geral, composto por materiais vesiculares homogêneos e eosinofílicos, contendo grânulos basófilos ou acidófilos incorporados, os quais apresentam entre as espécies de diferentes famílias grande variação em relação a forma e composição histoquímica. Quando observado em nível ultraestrutural, o conteúdo luminal pode ser constituído por vesículas ou grânulos com formato circular, irregular ou em bastão, como observado em *A. patagoniensis*, nos Ocypodidae e em grande parte dos Grapsoidea aqui analisados. De maneira bastante exclusiva, as espécies de Sesarmidae mostraram um padrão de fluido seminal mais complexo, sendo formado por um núcleo homogêneo denso em formato esférico ou oval, além de uma porção periférica de aspecto menos eletrodenso. Adicionalmente, no interior dos espermatóforos de todos os seus representantes, os espermatozoides além de estarem imersos em sua matriz, estão envolvidos por uma camada delgada de secreção. Assim, o fluido seminal e a camada seminal que envolve os espermatozoides podem ser consideradas sinapomorfias de Sesarmidae.

A análise filogenética baseada na máxima verossimilhança resultou em uma árvore evolutiva que oferece suporte à monofilia do grupo Thoracotremata. Os representantes da superfamília Pinnotheroidea foram encontrados como um grupo monofilético. No entanto, o agrupamento monofilético das superfamílias Ocypodoidea e Grapsoidea foi rejeitado devido à posição das famílias que as compõem. No primeiro clado da árvore, os representantes da superfamília Pinnotheroidea foram encontrados próximos aos Ocypodoidea, sendo Pinnotheridae e Ocypodidae monofiléticas, compartilhando um ancestral comum próximo. A análise do SRM de *A. patagoniensis*, somados às descrições existentes para *Pinnixa* sp. por (Krol et al., 1992) *Pi. pisum*, *N. pinnotheres* em Becker et al., (2013) indica que em todos os representantes de Pinnotheridae, o fluido seminal produzido pelo vaso deferente e glândulas acessórias é composto por uma matriz, onde estão imersos grânulos de secreção com forma irregular,

sendo ausente a secreção do tipo goticular/granular, as quais podem ser as sinapomorfias do grupo. De maneira ímpar, as espécies de Pinnotheridae aqui estudadas, as quais formam clados irmãos com *Pinnotheres* e *Nepinnotheres*, tiveram os espermátóforos concentrados na porção proximal da MVD, sendo a MVD distal somente preenchida por secreção glandular. Esta secreção da MVD não se misturou com as secreções das AG, e foi encontrada até dentro do ducto ejaculatório, sendo característica única do grupo e não observada por Becker et al. (2013).

Pinnotheridae e Ocypodidae compartilham a presença de glândulas acessórias com superfície lisa, parede dos espermátóforos na região média do vaso deferente fortemente positiva para polissacarídeos neutros e secreção granular produzida pelas AGs, com forte reação para proteínas e polissacarídeos neutros. Entre as principais diferenças entre tais famílias, observa-se grande variação na morfologia da parede dos espermátóforos. Os espermátóforos podem ser simples, sem uma parede definida, como observado no Ocypodidae *O. quadrata*, ou podem ser formados por apenas uma camada de secreção, como descrito para os pinoterídeos *Pi. pisum* e *N. pinnotheres* por Becker et al. (2013), e observado em *U. cordatus* (presente estudo), *L. thayeri*, *M. vocator* e *Uca maracoani* por Benetti et al. (2008). Duas camadas de secreção constituem a parede dos espermátóforos de *L. uruguayensis* como observado por Cuartas & Sousa (2007). Por sua vez, em *A. patagoniensis* e *D. crinitichelis*, a parede dos espermátóforos é constituída por três películas delgadas e de maneira bastante exclusiva, em *M. mordax*, a parede dos espermátóforos é formada por cinco camadas de secreção.

No segundo grande clado, os ocipodóideos das famílias Xenophthalmidae e Dotillidae foram separados das outras famílias analisadas, formando um grupo irmão. As famílias Varunidae, Grapsidae, Sesarmidae e Plagusiidae foram identificadas como monofiléticas. Varunidae e Macrophthalmidae formam um grupo irmão, e juntas são grupo irmão de Mictyridae. Os grapsóideos das famílias Xenograpsidae e Leptograpsidae são grupos irmãos de Varunidae, Macrophthalmidae e Mictyridae, e este grande grupo é agrupado como irmão de Grapsidae e Percnidae. O último subclado é formado pelos representantes de Sesarmidae e Gecarcinidae + Plagusiidae. Glyptograpsidae é grupo irmão de todas as famílias do segundo grande clado, exceto Xenophthalmidae e Dotillidae. Cryptochiridae também é monofilético e está separado das famílias do segundo grande clado.

A análise do sistema reprodutor de Varunidae demonstrou que suas espécies compartilham a presença de espermátóforos com parede delgada, eletrolúcida, positivos

para polissacarídeos neutros e ácidos. O interior dos espermatóforos é marcado por secreção fracamente positiva para proteínas e positiva para polissacarídeos ácidos e nas regiões mais posteriores do vaso, elas tornam-se intensamente positivas, assim como observado em todos os outros grapsóideos, exceto em Pinnotheridae.

Em conclusão, a presença de AG, espermatóforos com parede desenvolvida, nunca mucosos, com matriz interna fracamente positiva para proteínas e positiva para polissacarídeos ácidos, são provavelmente características plesiomórficas de Thoracotremata. Em Pinnotheridae, a ausência de polissacarídeos ácidos na matriz do espermatóforo pode ser considerada como apomorfia para a família. Adicionalmente, a mistura de secreção da AGC e MVD, levando a presença de poucos espermatóforos, esparsos na PVD também é compartilhado por todos os clados. Somente *A. patagoniensis* e *D. crinitichelis* apresentam espermatóforos somente na região proximal da MVD. Na região distal, a MVD tem a mesma secreção sem espermatóforos, e esta não se mistura com material glandular, ocorrendo até o ducto ejaculatório, após a glândula. Esta é uma característica compartilhada e ímpar para as espécies brasileiras, porém em *Pi. pisum* e *N. pinnotheres* parece haver a presença de espermatóforos e mistura da secreção na PVD (Becker et al., 2013). Desta maneira, fica claro que a MVD é extremamente alongada nos Thoracotremata e, devido ao tipo de secreção sempre característica, alterada pela presença das AG é indicado que o padrão anatômico correto é considerar como PVD a região a partir da abertura das AG, sendo a PVD terminando no ducto ejaculatório, o qual possui várias camadas musculares. Portanto, características anatômicas e histológicas justificam esta classificação em detrimento das várias outras duvidosas e superficiais encontradas na literatura científica. Assim, é imprescindível o respeito as regras da anatomia e histologia, evitando criar nomenclaturas, termos e novas áreas para o SRM em crustáceos. Isso evita aumentar ainda mais a confusão entre autores não especializados em Histologia e Biologia Celular. A anatomia e a histologia indicam que existe a possibilidade anátomo-histológica para a formação de pacotes espermáticos em Thoracotremata, caso as fêmeas copulem com mais de um macho. Contudo, o grande volume de secreção da MVD e da AG também podem atuar somente para lubrificação dos espermatóforos na transferência espermática, uma vez que nunca foram observados pacotes espermáticos em Thoracotremata. Estudos futuros envolvendo a histologia e ultraestrutura do receptáculo seminal serão importantes para entender o papel desse fluido seminal nas fêmeas, tanto para a manutenção dos espermatóforos/espermatozoides ou até mesmo verificar se as fêmeas endocitam este material seminal que é extremamente dispendioso em termos

energéticos para a produção de polissacarídeos e proteínas, os quais poderiam atuar como presente nupcial.

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(2), 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(2), 171-184. <https://doi.org/10.1111/ivb.12214>
- Antunes, M., Zara, F. J., López-Greco, L. S., & Negreiros-Fransozo, M. L. (2016). Morphological analysis of the female reproductive system of *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura: Inachoididae) and comparisons with other Majoidea. *Invertebrate Biology*, 135(2), 75-86.
- Arai, T. I., Brandão, M. C., & Freire, A. S. (2017). First record of *Grapsus grapsus* (Linnaeus, 1758) (Brachyura: Decapoda: Grapsidae) in freshwater habitat. *Nauplius*, 25. <https://doi.org/10.1590/2358-2936e2017032>.
- Assugeni, C. O., Toyama, M. H., & Zara, F. J. (2021). From sperm plug formation to ovulation: morphological and ultrastructural modifications in the seminal receptacle of the blue crab *Callinectes danae*. *Zoologischer Anzeiger*, 291, 45-60. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2021.02.002>
- 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(11), 1312-1322. <https://doi.org/10.1002/jmor.20184>
- Benetti, A. S., Santos, D. C. D., 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>
- Beninger, P. G., Lanteigne, C., & Elner, R. W. (1993). Reproductive processes revealed by spermatophore dehiscence experiments and by histology, ultrastructure, and histochemistry of the female reproductive system in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius). *Journal of Crustacean Biology*, 13(1), 1-16.
<https://doi.org/10.1163/193724093X00408>
- Benhalima, K., & Moriyasu, M. (2000). Structure and function of the posterior vas deferens of the snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae). *Invertebrate Reproduction & Development*, 37(1), 11-23.
<https://doi.org/10.1080/07924259.2000.9652396>
- 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. (2015). Symbiotic brachyura. In *Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea, Volume 9 Part C (2 vols)* (pp. 543-581). Brill.
https://doi.org/10.1163/9789004190832_012
- Cuartas, E. I., & Sousa, L. G. (2007). Ultrastructural study of the spermatophores and spermatozoa in *Uca uruguayensis* (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). *Biociências*, 15(1), 21-28.
- 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. <https://doi.org/10.1163/193724089X00089>
- Diesel, R. (1991). NINE. Sperm Competition and the Evolution of Mating Behavior in Brachyura, with Special Reference to Spider Crabs (Decapoda, Majidae). In *Crustacean sexual biology* (pp. 145-163). Columbia University Press.
<https://doi.org/10.7312/baue90796-010>
- Eliss, 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>
- Ganapiriya, V., Suganthi, A. S., & Maharajan, A. (2017). Ultrastructure of the male accessory glands of sesarmid crab, *Parasesarma plicatum* (Latreille,

- 1803). *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 5(2), 111-117.
<https://doi.org/10.1016/j.jmau.2016.07.001>
- Garcia Bento, M. A., López 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., López Greco, L. S., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2022). From copula to fertilization: The reproduction of primitive crab *Hypoconcha parasitica* (Linnaeus, 1763) (Podotremata: Dromiidae). *The Anatomical Record*, 305(11), 3341-3355. <https://doi.org/10.1002/ar.24920>
- 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 and 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 Seances de l'Academie des Sciences, Paris, serie D*, 285, 1049-1052.
- Guinot, D., Jamieson, B. G. M., & Tudge, C. C. (1997). Ultrastructure and relationships of spermatozoa of the freshwater crabs *Potamon fluviatile* and *Potamon ibericum* (Crustacea, Brachyura, Potamidae). *Journal of Zoology*, 241(2), 229-244.
- Hartnoll, R. G. (1965, June). Notes on the marine grapsid crabs of Jamaica. In *Proceedings of the Linnean Society of London* (Vol. 176, No. 2, pp. 113-147). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1965.tb00940.x>
- Johnson, P. T. (1980). Histology of the blue crab, *Callinectes sapidus*: a model for the Decapoda.
- Jensen, P. C., Orensanz, J. M., & Armstrong, D. A. (1996). Structure of the female reproductive tract in the Dungeness crab (*Cancer magister*) and implications for the mating system. *The Biological Bulletin*, 190(3), 336-349. <https://doi.org/10.2307/1543026>
- Junqueira, L. C. U., & Junqueira, L. M. M. S. (1983). Técnicas básicas de citologia e histologia. *São Paulo: Santos*, 8, 3.
- Junqueira, L. C.; Carneiro, J (2017). Histologia básica. 13ª edição. Rio de Janeiro - RJ: Guanabara Koogan.

- Katoh, K., Standley, D.M., 2016. A simple method to control over-alignment in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics*, 32, 1933–1942. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw108>.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, ... and Drummond A (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>
- Kitaura, J., Wada, K., & Nishida, M. (2002). Molecular Phylogeny of Grapsoid and Ocypodoid Crabs with Special Reference to the Genera *Metaplex* and *Macrophthalmus*. *Journal of Crustacean Biology*, 22(3), 682-693. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990281>
- Klaus, S., & Brandis, D. (2011). Evolution of sperm morphology in potamid freshwater crabs (Crustacea: Brachyura: Potamoidea). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 161(1), 53-63. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2009.00625.x>
- Klaus, S., Münzner, S., Modenbach, A. C., Streit, B., & Tudge, C. C. (2013). Spermatophore formation and sperm ultrastructure of *Sundathelphusa philippina* (Crustacea: Brachyura: Gecarcinucidae). *Acta Zoologica*, 94(3), 267-272. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2011.00550.x>
- 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.
- Krol, R. M.; Hawkins, W. E.; Overstreet, R. M. 1992. Reproductive components, pp. 295-343. In: Harrison, F. W.; Humes, A. G. (eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Vol. 10: Decapod Crustacea, Wiley-Liss Inc., New York.
- López Greco, L. S. (2013). Functional anatomy of the reproductive system. *Functional morphology and diversity*, 1, 413.
- Luo A, Qiao H, Zhang Y, Shi W, Ho SY, Xu W, Zhang A, Zhu C. (2010). Performance of criteria for selecting evolutionary models in phylogenetics: a comprehensive study based on simulated datasets. *BMC Evolutionary Biology*, 10(242): 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-242>
- Maddison, W. P. and D.R. Maddison. 2021. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.7.

- Mantelatto, F. L., Tamburus, A. F., Magalhães, T., Buranelli, R. C., Terossi, M., Negri, M., Castilho, A. L., Costa, R. C., & Zara, F. J. (2020). Checklist of decapod crustaceans from the coast of the São Paulo state (Brazil) supported by integrative molecular and morphological data: III. Infraorder Brachyura Latreille, 1802. *Zootaxa*, 4872(1), [zootaxa.4872.1.1](https://doi.org/10.11646/zootaxa.4872.1.1).
<https://doi.org/10.11646/zootaxa.4872.1.1>
- McLay, C. L. (2001). The Dromiidae of French Polynesia and a new collection of crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura) from the Marquesas Islands. *Zoosystema-Paris*, 23(1), 77-100.
- 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. https://doi.org/10.1163/9789004190832_006
- 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.
- Mello, M. L. S., & Vidal, B. D. C. (1980). Práticas de biologia celular. *São Paulo: Edgard Blücher/Funcamp*, 57, 58.
- 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>
- Nascimento, F. A. D., & Zara, F. J. (2013). Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Brachyura: Portunidae). *Nauplius*, 21, 161-177.
- 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>
- 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>

- Paradis E, Schliep K (2019). “ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R.” *Bioinformatics*, 35, 526-528. doi:10.1093/bioinformatics/bty633.
- Reger, J. F. (1970). Studies on the fine structure of spermatids and spermatozoa of the crab, *Pinnixia* sp. *Journal of Morphology*, 132(1), 89-99.
- Ryan, E. P. (1967). Structure and function of the reproductive system of the crab, *Portunus sanguiolentus* Herbst, (Brachyura, Portunidae). II. The female system. In *Proc Symp Crustacea* (pp. 522-544).
- Ross, M. H.; Pawlina, W. (2016). Histologia: texto e atlas, correlações com Biologia celular e molecular. 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1-2, 23, 73, 98, 105.
- 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, Sesamidae). *Brazilian Journal of Biology*, 69, 161-169. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842009000100021>
- Sasikala, S. L., & Subramoniam, T. (1987). On the occurrence of acid mucopolysaccharides in the spermatophores of two marine prawns, *Penaeus indiens* (Milne-Edwards) and *Metapenaeus monoceros* (Fabricius)(Crustacea: Macrura). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 113(2), 145-153. [https://doi.org/10.1016/0022-0981\(87\)90161-4](https://doi.org/10.1016/0022-0981(87)90161-4)
- 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(5), 345-361. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2009.02.002>
- Shinozaki-Mendes, R. A., Silva, J. R., & Hazin, F. H. (2012). Development of male reproductive system of the blue land crab *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1828

- (Decapoda: Gecarcinidae). *Acta Zoologica*, 93(4), 390-399. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2011.00513.x>
- Sudhadevi, A. R., & Adiyodi, R. G. (1995). The coral-shaped accessory gland of the ghost crab, *Ocypode ceratophthalmus*. *Journal of Animal Morphology and Physiology*, 42, 69-73.
- 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*, 269, 166-176. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2017.07.002>
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T., von Haeseler, A., & Minh, B. Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic acids research*, 44(W1), W232-W235.
- Tsang, L. M., Schubart, C. D., Ahyong, S. T., Lai, J. C. Y., Au, E. Y. C., Chan, T.-Y., Ng, P. K. L., & 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., Schubart, C. D., Chu, K. H., Ng, P. K., & 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.
- Urbani, N., Sainte-Marie, B., Sévigny, J. M., Zadworny, D., & Kuhnlein, U. (1998). Sperm competition and paternity assurance during the first breeding period of female snow crab (*Chionoecetes opilio*) (Brachyura: Majidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 55(5), 1104-1113. <https://doi.org/10.1139/f98-006>
- Shinozaki-Mendes, R. A., Silva, J. R., & Hazin, F. H. (2012). Development of male reproductive system of the blue land crab *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1828 (Decapoda: Gecarcinidae). *Acta Zoologica*, 93(4), 390-399. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2011.00513.x>

- Watanabe, T. T., Nascimento, F. A., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2020). Ultrastructure and histochemistry of the male reproductive system of the genus *Callinectes* Stimpson, 1860 (Brachyura: Portunidae). *Journal of Morphology*, 281(12), 1660-1678. <https://doi.org/10.1002/jmor.21277>
- Watanabe, T. T., López-Greco, L. S., & Zara, F. J. (2022). Seminal fluid and spermatophore production in a western Atlantic invasive swimming crab, *Charybdis hellerii*, reveals a different pattern to Portunoidea. *Arthropod Structure & Development*, 66, 101137. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2021.101137>
- Wolfe, J. M., Ballou, L., Luque, R., Watson-Zink, V. M., Ah Yong, S. T., Barido-Sottani, J., Chan, T. Y., Chu, K. H., Crandall, K. A., Daniels, S. R., Felder, D. L., Mancke, H., Martin, J. W., Ng, P. K. L., Ortega-Hernández, J., Palacios Theil, E. N., Pentcheff, D., Robles, R., Thoma, B. P., Tsang, L. M., Wetzler, R., Windsor, A. M., Bracken-Grisson, H. D. (2022). Convergent adaptation of true crabs (Decapoda: Brachyura) to a gradient of terrestrial environments. *BioRxiv*, 2022-12.
- 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>
- Zara, F. J., Raggi Pereira, G. 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>

Material suplementar

Tabela 1. Amostragem de táxons, números de acesso do GenBank e composição dos dados de sequência usados para análises filogenéticas.

Espécies	COI	16S	12S	AK	ATPS	Eno	GAPDH	H3	NaK	PEPCK	SAP
<i>Achelous spinimanus</i>	JX123456	MG515574						MZ955030			
<i>Acmaeopleura parvula</i>		ON379442	ON379391	ON379507	ON379588	ON379652	ON379724	ON379778	ON379828	ON379883	ON379965
<i>Afruca tangeri</i>	LC150399	AB813666									
<i>Anatolikos japonicus</i>				GU382899	ON379542	GU382949	GU382998	KJ133079	EU427127	EU427196	ON379914
<i>Ankerius aenigmaticus</i>		MF124810		ON379534	ON379621	ON379679	ON379749	MF124816	ON379856		ON380001
<i>Aratus pisonii</i>	KU313075	KU313096	AJ784289	EU329143				KU313206			
<i>Arcotheres sp.</i>		KJ132515	KJ132376	KJ132657	ON379624	KJ132789	ON379752	KJ133068	KJ133214	KJ133341	ON380004
<i>Armases angustipes</i>	MF490071	ON379429	ON379385	ON379495	ON379578	ON379639	ON379711	ON379767	ON379816	ON379878	ON379953
<i>Armases cinereum</i>	KU905859	ON379430	ON379386	ON379496	ON379579	ON379640	ON379712	ON379768	ON379817	ON379879	ON379954
<i>Armases rubripes</i>	KU313187	KT279701									
<i>Atergatis integerrimus</i>	MT162488	KF220498	KJ132375	KJ132656	ON379557	KJ132788	KJ132928	KJ133067	KJ133213	KJ133340	ON379929
<i>Austinixa patagoniensis</i>	JX839526	JX839479	KU679490					KU679768			
<i>Austruca annulipes</i>	ON261018	ON379459	ON379408	ON379525	ON379609	ON379671	ON379741	ON379795	ON379847	ON379896	ON379990
<i>Austruca lactea</i>	MT210073	KJ132647	KJ132504	KJ132778	ON379610	KJ132918	KJ133056	KJ133203	KJ133330	ON379897	ON379991
<i>Baruna trigranulum</i>		ON379452	ON379402	ON379517		ON379663	ON379734	ON379788	ON379839	ON379891	ON379976
<i>Callinectes ornatus</i>	MT272147	MT271187	DQ407703								
<i>Cardisoma carnifex</i>	NC_039105	ON379426	ON379382	ON379478	ON379560	ON379635	ON379694	ON379764	ON379813	ON379870	ON379935
<i>Cardisoma crassum</i>		KJ132520	KJ132381	KJ132661	ON379561	KJ132794	KJ132934	KJ133075	KJ133219	KJ133346	ON379936
<i>Cardisoma guanhumi</i>	MF490075	MF490171									
<i>Carpilius convexus</i>	HM638025	AF501721	AF501694	ON379469	ON379544	KJ132792	KJ132932	KJ133071	KJ133217	KJ133344	ON379916
<i>Chasmagnathus convexus</i>	MZ832028	ON379443	ON379392	ON379508		ON379653	ON379725	ON379779	ON379829	ON379884	
<i>Clistocoeloma villosum</i>	MZ832040	ON379431	ON379387	ON379497		ON379641	ON379713	ON379769	ON379818		
<i>Conchoecetes artificiosus</i>		KJ132518	KJ132379	GU382900	ON379539	GU382950	GU382999	KJ133073	EU427129	EU427198	ON379909
<i>Cyclodius unglatus</i>	ON828353	ON379423		ON379475	ON379558	ON379632	ON379691	ON379761	ON379810	ON379868	ON379930
<i>Cyclograpsus integer</i>	MF490079	AJ250639	DQ343270					FN434061			
<i>Cyclograpsus intermedius</i>	JX502896	ON379444	ON379393	ON379509	ON379589	ON379654	ON379726	ON379780	ON379830	ON379885	ON379966
<i>Cyclograpsus punctatus</i>	KP202498										
<i>Cyrtograpsus angulatus</i>		AJ278836									
<i>Dacryomaia edmonsoni</i>		ON379425	ON379381	ON379477		ON379634	ON379693	ON379763	ON379812		ON379933
<i>Dacryomaia sp.</i>		KJ132532	KJ132393	KJ132672		KJ132805	KJ132944	KJ133088	KJ133227		ON379934
<i>Dissodactylus crinitichelis</i>	JX839521	KU679649	KU679512					KU679788			
<i>Dorippe quadridens</i>	EU636979	KJ132536	KJ132398	KJ132676	ON379545	KJ132810	KJ132949	KJ133093	KJ133232	KJ133355	ON379917
<i>Dotilla myctiroides</i>	LC150452	KJ132534	KJ132396	KJ132675	ON379599	KJ132808	KJ132947	KJ133091	KJ133230	KJ133354	ON379978
<i>Dotilla wichmanni</i>	MZ832041	KJ132538	KJ132400	KJ132678	ON379600	KJ132812	KJ132951	KJ133095	KJ133234	ON379893	ON379979
<i>Episesarma versicolor</i>	MZ832045	ON379432			ON379580	ON379642	ON379714		ON379819		ON379955
<i>Epixanthus frontalis</i>	MZ832047	KJ132545	KJ132406	KJ132683	ON379547	KJ132818	KJ132957	KJ133102	KJ133239	KJ133361	ON379919
<i>Eplumula phalangium</i>		KJ132543		KJ132681	ON379540	KJ132816	KJ132955	KJ133100	EU427131	EU427200	ON379911
<i>Eriocher japonica</i>	AF516700	KJ132542	KJ132404	GU382901		GU382951	GU383000	KJ133099	EU427132	EU427201	ON379967
<i>Eriocher sinensis</i>	KT209097	AJ250642	DQ517315								
<i>Ethusina sp.</i>		ON379417	ON379374	ON379470	ON379546	ON379627	ON379685	ON379756	ON379805	ON379862	ON379918
<i>Euchirograpsus danielae</i>		ON379428	ON379384	ON379494		ON379638	ON379710	ON379766	ON379815	ON379877	
<i>Gaetice depressus</i>	KP976222	KJ132553	KJ132414	KJ132691	ON379590	KJ132826	KJ132965	KJ133110	KJ133247	KJ133368	ON379968

Continuação na próxima página

<i>Gecarcinus quadratus</i>		ON379427	ON379383	ON379479	ON379562	ON379636	ON379695	ON379765	ON379814	ON379871	ON379937
<i>Gecarcoidea lalandii</i>	NC_057475	KJ132555	KJ132416	KJ132693	ON379563	KJ132828	KJ132967	KJ133112	KJ133249	KJ133370	ON379938
<i>Gecarcoidea natalis</i>	NC_039811	KJ132556	KJ132417	KJ132694	ON379564	KJ132829	KJ132968	KJ133113	KJ133250	KJ133371	ON379939
<i>Gelasimus borealis</i>	NC_038177	KJ132645	KJ132502	KJ132776	ON379611		KJ133054	KJ133201	KJ133329	KJ133440	ON379992
<i>Gelasimus vocans</i>	ON193470	ON379460	ON379409	ON379526	ON379612	ON379672	ON379742	ON379796	ON379848	ON379898	
<i>Geograpsus crinipes</i>		KM510095	KM510063	ON379480		KM510004	ON379696	KM510127	KM510032		
<i>Geograpsus lividus</i>	KU313194	KM510097	KM510065	ON379481		KM510006	ON379697	KM510129	KM510034		
<i>Geograpsus stormi</i>		KM510098	KM510066	ON379482		KM510007	ON379698	KM510130	KM510035		
<i>Geosesarma hagen</i>		ON379433		ON379498	ON379581	ON379643	ON379715	ON379770			ON379956
<i>Glyptograpsus jamaicensis</i>		KJ132554	KJ132415	KJ132692	ON379566	KJ132827	KJ132966	KJ133111	KJ133248	KJ133369	ON379941
<i>Goniopsis cruentata</i>	KU313325	KM510099		ON379483		KM510008	ON379699	KM510131	KM510036		
<i>Goniopsis pulchra</i>	KU313191	KM510100	KM510068	ON379484		KM510009	ON379700	KM510132	KM510037		
<i>Grapsus albolineatus</i>	MN689986	KJ132551	KJ132412	KJ132689	ON379567	KJ132824	KJ132963	KJ133108	KJ133245	KJ133366	ON379942
<i>Grapsus granulatus</i>		KM510102	KM510070	ON379485		KM510011	ON379701	KM510133	KM510039		
<i>Grapsus grapsus</i>	MN184051	KM510103	KM510071	ON379486	ON379568	KM510012	ON379702	KM510134	KM510040	ON379872	ON379943
<i>Grapsus tenuicrustatus</i>	KX550280	KM510105	KM510073	ON379487	ON379569	KM510014	ON379703	KM510136	KM510042	ON379873	
<i>Gustavus mecnathus</i>		MF124811	MF124805	ON379535	ON379622	ON379680	ON379750	MF124817	ON379857	ON379904	ON380002
<i>Heloecius cordiformis</i>	LC097138	ON379455	ON379404	ON379520	ON379604	ON379666		ON379791	ON379842	ON379895	ON379984
<i>Hemigrapsus penicillatus</i>	MZ832062	ON379445	ON379394	ON379510		ON379655	ON379727	ON379781	ON379831	ON379886	
<i>Hemigrapsus sanguineus</i>	EU169917	ON379446	ON379395	ON379511	ON379591	ON379656	ON379728	ON379782	ON379832	ON379887	ON379969
<i>Hemiplax hirtipes</i>		ON379456	ON379405	ON379521	ON379605	ON379667	ON379737	ON379792	ON379843		ON379985
<i>Holothuriophilus pacificus</i>	MW544379	EU934997	KU679521	ON379537	ON379625	ON379682	ON379753	KU679796	ON379859	ON379906	ON380005
<i>Homola orientalis</i>	ON991500	KJ132562	KJ132423	KJ132699		KJ132834	KJ132973	KJ133119	KJ133254	KJ133376	
<i>Ilyograpsus paludicola</i>	MZ832064	ON379457	ON379406	ON379522	ON379606	ON379668	ON379738	ON379793	ON379844		ON379986
<i>Ilyogynnis microcheirum</i>		ON379453	ON379403	ON379518		ON379664	ON379735	ON379789	ON379840	ON379892	ON379977
<i>Johngarthia lagostoma</i>	KM578831	KT159734									
<i>Johora tiomanensis</i>	AB290644	KJ132565	KJ132426	KJ132702	ON379554	KJ132837	KJ132976	KJ133122	KJ133256	KJ133378	ON379926
<i>Labuanium trapezoideum</i>		ON379434	ON379388	ON379499	ON379582	ON379644	ON379716	ON379771	ON379820	ON379880	ON379957
<i>Lauridromia dehaani</i>	ON849091	KJ132568	KJ132429	KJ132705		KJ132840	KJ132979	KJ133125	EU427134	EU427203	ON379910
<i>Leptograpsodes octodentatus</i>		KM510106	KM510074				ON379709	KM510137	KM510043		
<i>Leptuca thayeri</i>	KU313431	KU313138						KU313238			
<i>Lybia tessellata</i>	MT413368	KJ132572	KJ132434	KJ132708		KJ132844	KJ132983	KJ133130	KJ133262	KJ133383	ON379931
<i>Lyreidus tridentatus</i>		KJ132575	KJ132437	KJ132710		KJ132845	KJ132985	KJ133133	KJ133264	KJ133385	ON379912
<i>Macrocheira kaempferi</i>	LC309100	ON379420	ON379377	ON379473	ON379551	ON379630	ON379688	ON379759	ON379808	ON379865	ON379923
<i>Macrophthalmus purpureocheir</i>	LC097132	LC097107									
<i>Macrophthalmus definitus</i>	MZ832075	KJ132577	KJ132439	KJ132712	ON379607	KJ132848	KJ132987	KJ133135	KJ133265		ON379987
<i>Macrophthalmus erato</i>	LC097124	KJ132580	KJ132442	KJ132715		KJ132851	KJ132990	KJ133138	KJ133268		
<i>Macrophthalmus milloti</i>	LC097130	MF124812	MF124806	ON379523	ON379608	ON379669	ON379739	MF124818	ON379845		ON379988
<i>Megaesthesius yokoyai</i>		ON379419	ON379376	ON379472	ON379549	ON379629	ON379687	ON379758	ON379807	ON379864	ON379921
<i>Metacarcinus magister</i>	KX039752	KJ132584	KJ132446	KJ132719	ON379543	KJ132855	KJ132994		KJ133272	KJ133391	ON379915
<i>Metaplex tredecim</i>	MZ832088		ON379396	ON379512	ON379592	ON379657	ON379729		ON379833		ON379970
<i>Metasesarma obesum</i>	ON455011	ON379435		ON379500		ON379645	ON379717	ON379772	ON379821		ON379958

Continuação na próxima página

<i>Metopograpsus frontalis</i>	MZ832092	KJ132586	KJ132448	KJ132721	ON379570	KJ132857	KJ132991	KJ133143	KJ133274	KJ133392	
<i>Metopograpsus messor</i>		MF469798	MF469766								
<i>Metopograpsus quadridentatus</i>	NC_038178	KJ132602	KJ132463	KJ132736	ON379571	KJ132873	ON379704	KJ133157	KJ133288	KJ133404	ON379944
<i>Metopograpsus thukuhar</i>	MH298870	KM510112	KM510080	ON379488		KM510019	ON379705		KM510049	ON379874	ON379945
<i>Mictyris brevidactylus</i>	MZ832097	KJ132576	KJ132438	KJ132711		KJ132847	KJ132986	KJ133134			ON379989
<i>Mictyris longicarpus</i>	MG321159								EU427135	EU427204	
<i>Minuca mordax</i>	KU313196	KU313181									
<i>Minuca vocator</i>	MF490126	MF490222									
<i>Mithraculus forceps</i>	KX398198	ON379422	ON379379	KJ132718	ON379553	KJ132854	ON379690	KJ133141	KJ133271	ON379867	ON379925
<i>Nanhaipotamon hongkongense</i>	NC_057474	KJ132593	KJ132455	KJ132728	ON379555	KJ132864		KJ133150	KJ133281	KJ133399	ON379927
<i>Neohelice granulata</i>	KU313193	KU313178									
<i>Neoliomera demani</i>	HM751035	ON379424	ON379380	ON379476	ON379559	ON379633	ON379692	ON379762	ON379811	ON379869	ON379932
<i>Neoxenophthalmus obscurus</i>		ON379466	ON379415	ON379532		ON379678		ON379802	ON379854	ON379902	ON379999
<i>Nepinnotheres cf. affinis</i>		KJ132590	KJ132452	KJ132725	ON379626	KJ132861	KJ133000	KJ133147	KJ133278	KJ133396	ON380006
<i>Neppinotheres pinnotheres</i>	MN341042	EU935001	KU679529					KU679804			
<i>Ocypode ceratophthalmus</i>	MW255974	KJ132595	KJ132456	KJ132730	ON379613	KJ132866	KJ133005	KJ133152	KJ133283	KJ133400	ON379993
<i>Ocypode mortoni</i>	AB751387	ON379461	ON379410	ON379527	ON379614	ON379673	ON379743	ON379797	ON379849	ON379899	ON379994
<i>Ocypode quadrata</i>	KU313197	FN539018						FN434069			
<i>Ocypode sinensis</i>	LC150427	KJ132596	KJ132457	KJ132731	ON379615	KJ132867	KJ133006	KJ133153	KJ133284	KJ133401	ON379995
<i>Orisarma dehaani</i>	MZ832113	ON379436	ON379389	ON379501	ON379583	ON379646	ON379718	ON379773	ON379822		ON379959
<i>Orisarma intermedium</i>	MZ832116	ON379437	ON379390	ON379502	ON379584	ON379647	ON379719	ON379774	ON379823		ON379960
<i>Pachygrapsus crassipes</i>	MW290926	KM510113	KM510081	ON379489	ON379572	KM510020		KM510142	KM510050		ON379946
<i>Pachygrapsus fakaravensis</i>	MN184703	KM510114	KM510082	ON379490	ON379573	ON379637	ON379706	KM510143	KM510051		ON379947
<i>Pachygrapsus gracilis</i>	MF490106	FR871303	KM510083	EU329122				KM510144	KM510052		
<i>Pachygrapsus marmoratus</i>	NC_039109	KM510117	KM510085	ON379491	ON379574	KM510023	ON379707	KM510146	KM510054	ON379875	ON379948
<i>Pachygrapsus plicatus</i>		KM510121	KM510089	ON379492		KM510026		KM510150	KM510057	ON379876	ON379949
<i>Pachygrapsus socius</i>			KM510090	ON379493		KM510027	ON379708	KM510151	KM510058		
<i>Pachygrapsus transversus</i>	KU313192	KM510123	KM510091			KM510028		KM510152	KM510059		
<i>Paradorippe granulata</i>	EU636974	KJ132601	KJ132462	KJ132735		KJ132872	KJ133010	KJ133156	EU427137	EU427206	
<i>Paraleptuca crassipes</i>	MG924083	KJ132646	KJ132503	KJ132777	ON379616	KJ132917	KJ133055	KJ133202	EU427142	EU427211	ON379996
<i>Parasesarma bidens</i>	LC510458	KJ132605	KJ132467	KJ132740	ON379585	KJ132877	KJ133014	KJ133161	KJ133292	KJ133408	ON379961
<i>Parasesarma catenatum</i>	MF564013	AJ784025	AJ784299						MT025976		
<i>Parasesarma erythrodactyla</i>	JX502945										
<i>Parasesarma unguatum</i>	MZ832138	ON379438		ON379503		ON379648	ON379720	ON379775	ON379824	ON379881	ON379962
<i>Parathelphusa pantherina</i>	KF201142	ON379418	ON379375	ON379471	ON379548	ON379628	ON379686	ON379757	ON379806	ON379863	ON379920
<i>Percnon affine</i>		KJ132608	KJ132468	KJ132743	ON379575	KJ132880	KJ133018	KJ133164	KJ133295	KJ133410	ON379950
<i>Percnon gibbesi</i>	JQ306102	AJ130803						FN434058			
<i>Percnon planissimum</i>	MW278121	KJ132620	KJ132478	KJ132754	ON379576	KJ132892	KJ133029	KJ133177	KJ133308	KJ133421	ON379951
<i>Pinnaxodes chilensis</i>		EU934998	KU679534	ON379538		ON379683	ON379754	KU679809	ON379860	ON379907	
<i>Pinnixa cylindrica</i>	MN341048	EU934963	KU679549			ON379684	ON379755		ON379861	ON379908	
<i>Plagusia depressa</i>	MN184063	FN538999	DQ343259					FN434046			
<i>Plagusia squamosa</i>	NC_063602	KJ132623	KJ132481	KJ132757	ON379577	KJ132895	KJ133032	KJ133180	KJ133310	KJ133423	ON379952
<i>Platychiropsus spectabilis</i>		KJ132622		KJ132756		KJ132894	KJ133031		KJ133309	KJ133422	

Continuação na próxima página

<i>Platymaia remifera</i>		ON379421	ON379378	ON379474	ON379552	ON379631	ON379689	ON379760	ON379809	ON379866	ON379924
<i>Potamon fluviatile</i>	MT522009	KJ132609	KJ132469	KJ132744	ON379556	KJ132881	KJ133019	KJ133165	KJ133296	KJ133411	ON379928
<i>Pseudograpsus crassus</i>		ON379447	ON379397	ON379513	ON379593	ON379658	ON379730	ON379783	ON379834	ON379888	
<i>Pseudohelice subquadrata</i>	NC_042685	ON379448	ON379398		ON379594	ON379659	ON379731	ON379784	ON379835	ON379889	ON379971
<i>Ptychognathus barbatus</i>		ON379449	ON379399	ON379514	ON379595	ON379660	ON379732	ON379785	ON379836	ON379890	ON379972
<i>Ranina ranina</i>	NC_023474	KJ132629	KJ132487	KJ132762	ON379541	KJ132901	KJ133038	KJ133186	EU427140	EU427209	ON379913
<i>Sarmatium germaini</i>	MZ832143	ON379439		ON379504	ON379586	ON379649	ON379721	ON379776	ON379825		ON379963
<i>Scopimera bitympa</i>	AB515322	KJ132630	KJ132488	KJ132763		KJ132902	KJ133039	KJ133187	KJ133315	KJ133428	
<i>Scopimera intermedia</i>	NC_057476	KJ132632	KJ132490	KJ132765		KJ132904	KJ133041	KJ133189	KJ133317	KJ133429	ON379980
<i>Scopimera proxima</i>		KJ132634	KJ132492	KJ132767	ON379601	KJ132906	KJ133043	KJ133191	KJ133319	KJ133431	ON379981
<i>Scopimera ryukyuensis</i>	LC519313	ON379454		ON379519	ON379602	ON379665	ON379736	ON379790	ON379841	ON379894	ON379982
<i>Selatium brockii</i>	MF564020	ON379440		ON379505		ON379650	ON379722	ON379777	ON379826	ON379882	
<i>Selwynia madang</i>		MF124813	MF124807	ON379536	ON379623	ON379681	ON379751	MF124819	ON379858	ON379905	ON380003
<i>Sesarma rectum</i>	KU313375	AJ225866						KU313231			
<i>Sesarma reticulatum</i>	KX400927	KX423826	DQ343266	EU329115				FN434062	KX394829		
<i>Sesarmoides borneensis</i>		ON379441		ON379506	ON379587	ON379651	ON379723		ON379827		ON379964
<i>Thalassograpsus harpax</i>		ON379450	ON379400	ON379515	ON379596	ON379661		ON379786	ON379837		ON379973
<i>Tiarinia sp.</i>		KJ132639	KJ132496	KJ132771	ON379550	KJ132911	KJ133048		KJ133324	KJ133436	ON379922
<i>Tmethypocoelis ceratophora</i>	MZ832154	KJ132638		KJ132770	ON379603	KJ132910	KJ133047	KJ133195	KJ133323	KJ133435	ON379983
<i>Tritodynamia horvathi</i>	NC_063614	ON379458	ON379407	ON379524		ON379670	ON379740	ON379794	ON379846		
<i>Tubuca acuta</i>	ON193477	ON379462	ON379411	ON379528	ON379617	ON379674	ON379744	ON379798	ON379850	ON379900	
<i>Tubuca arcuata</i>	NC_058243	ON379463	ON379412	ON379529	ON379618	ON379675	ON379745	ON379799	ON379851	ON379901	ON379997
<i>Tubuca rhizophorae</i>	ON193495	ON379464	ON379413	ON379530	ON379619	ON379676	ON379746	ON379800	ON379852		
<i>Tuerkayana hirtipes</i>	MT514317	FM863830	KJ132394	KJ132673	ON379565	KJ132806	KJ132945	KJ133089	KJ133228	KJ133352	ON379940
<i>Uca maracoani</i>	LC087974	KT279699							JX854012		
<i>Ucides cordatus</i>	KU313504	ON379465	ON379414	ON379531		ON379677	ON379747	ON379801	ON379853		ON379998
<i>Varuna litterata</i>	LC498194	ON379451	ON379401	ON379516	ON379597	ON379662	ON379733	ON379787	ON379838		ON379974
<i>Xenograpsus testudinatus</i>	NC_013480	KJ132652	KJ132509	KJ132783	ON379598	KJ132923	KJ133061	KJ133208	KJ133335	KJ133445	ON379975
<i>Xenophthalmus pinnotheroides</i>	NC_063601	ON379467	ON379416	ON379533	ON379620		ON379748	ON379803	ON379855	ON379903	ON380000

Capítulo II

Caracteres ultraestruturais e a evolução dos espermatozoides nos caranguejos Pinnotheridae e Ocypodidae (Thoracotremata)

Resumo

Este trabalho investigou a ultraestrutura dos espermatozoides em caranguejos Pinnotheridae e Ocypodidae, comparando com outras espécies de Thoracotremata descritas na literatura. O objetivo foi identificar características únicas para cada família e discutir as diferenças de caracteres entre as famílias de estudadas procurando entender a evolução da ultraestrutura do espermatozoide. Amostras do vaso deferente médio foram processados segundo rotina para microscopia eletrônica de transmissão. Nas duas famílias estudadas, o opérculo encontrado no polo anterior ou apical é perfurado, eletrodenso, com botão apical, e na sua margem está aba periopercular. Na margem da região subopercular encontra-se o anel opercular acessório. O núcleo porta braços radiais e a vesícula acrossomal possui anel espessado eletrodenso em contato com o material eletrolúcido da cápsula. A cápsula termina na margem anterior deste anel. Os Pinnotheridae *Dissodactylus crinitichelis* e *Austinixa patagoniensis* bem como outros pinoterídeos descritos na literatura, possuem como características exclusivas, a presença do material supraopercular, um curto anel opercular acessório trilaminar e margem apical da câmara perforatorial com área menos eletrodensa. Ocypodidae não apresentou nenhuma característica exclusiva, com exceção daquelas compartilhadas com Pinnotheridae. *Minuca mordax* apresenta três zonas concêntricas no acrossomo, com a externa apresentando lamelas concêntricas. *Ocypode quadrata* apresenta o mesmo número de zonas, sem presença de lamelas concêntricas, mas entre a zona interna e a intermediária ocorre um espesso anel xantídeo modificado. Este anel também é observado em *Ucides cordatus*, porém é delgado. Esta última espécie apresenta outras apomorfias, como a presença de quatro zonas concêntricas, sendo a mais interna raiada, e a intermediária com aspecto de impressão digital, o que é único em Thoracotremata e homoplásico em relação a Heterotremata. Outras características apomórficas observadas foram o opérculo não perfurado e ausência do botão apical, consideradas como sinapomorfias em Thoracotremata. Como a filogenia molecular agrupou todos os táxons de Ocypodidae, talvez mais espécies precisem ser analisadas a fim de confirmar uma sinapomorfia espermática na família ou ao menos para as subfamílias Ocypodinae, Gelasiminae e Ucidinae.

Palavras-chave: Brachyura, espermiotaxonomia, Eubrachyura.

Introdução

Thoracotremata Guinot, 1977 agrupa caranguejos que possuem característica anatômica a presença de aberturas genitais localizadas no esterno torácico, incluindo diversas famílias, entre as quais estão Pinnotheridae de Haan, 1833 e Ocypodidae Rafinesque, 1815 (Guinot, 1977). Pinnotheridae, popularmente conhecidos como caranguejos-ervilha, sendo em sua maioria caranguejos de pequeno porte, os quais estabelecem relação simbiótica com outros organismos. Esses caranguejos vivem de forma comensal, atuando como endossimbiontes, entre as branquiais de bivalves, gastrópodes e quítons. Além disso, podem também ser encontrados no sistema digestório ou respiratório de holotúrias e equinóides, e como ectossimbiontes na superfície externa de vários equinóides (Zmarzly, 1992; Castro, 2015; de Gier & Becker, 2020; Theil & Felder, 2020; Hultgren et al., 2022). Por outro lado, os representantes da família Ocypodidae não são conhecidos por simbiose com outros organismos, sendo encontrados em estuários de regiões tropicais e subtropicais, com algumas espécies endêmicas de áreas de manguezal. Certas espécies representam importante recurso pesqueiro para populações ribeirinhas, como por exemplo os representantes do gênero *Ucides* Rathbun, 1897, popularmente conhecidos como caranguejo-uçá (Pinheiro et al., 2016).

Estudos recentes de reconstrução filogenética molecular sugerem que as famílias Cryptochiridae Paulson, 1875 e Pinnotheridae, apresentam estreita relação (Becker et al., 2011; Castro, 2015; Vehof et al., 2016). Essas famílias formam um clado junto a família Ocypodidae, e análises sugerem a possibilidade de um ancestral comum simbiótico para esse agrupamento. Alguns autores propuseram que Cryptochiridae e Pinnotheridae estão intimamente relacionados, tendo em vista características morfológicas do sistema reprodutor feminino (Becker et al., 2011; Castro, 2015; Vehof et al., 2016). Porém, tais caracteres podem ser comuns a outras famílias de crustáceos. Tsang et al. (2022) realizaram análises moleculares que sugeriram uma possível relação de proximidade entre as três famílias, embora os resultados tenham sido acompanhados de algumas incertezas, devido a divergências morfológicas e genéticas entre Cryptochiridae e Pinnotheridae.

A família Ocypodidae é composta por duas subfamílias: Ocypodinae Rafinesque, 1815, a qual inclui os caranguejos-fantasmas e Ucinae Dana, 1851, abrigando os caranguejos violinistas ou chama-maré (Ng et al., 2008). Adicionalmente, foi sugerido que espécies do gênero *Ucides* poderiam ser agrupadas na subfamília Ucidinae Števčić, 2005 ou, até mesmo em uma família, a Ucididae Števčić, 2005, por exibirem algumas apomorfias, como: a estrutura corneal e da carapaça, segmentação pleonal dos machos,

ausência de cerdas na base dos pereópodos, dentre outras (para revisão ver Ng et al., 2008; Davie et al., 2015). No entanto, estudos filogenéticos moleculares realizados por Kitaura et al. (2002), Schubart et al. (2006) e Shih et al. (2016), contestaram essa classificação, sendo o último trabalho, o estudo mais recente, o qual sugere que os gêneros de Ocypodidae sejam divididos em três subfamílias: Ocypodinae (com os gêneros *Afruca* Crane, 1975, *Ocypode* Weber, 1795 e *Uca* Leachm 1814), Gelasiminae Miers, 1886 (com os gêneros *Austruca* Miers, 1886, *Cranuca* Beinlich & von Hagen, 2006, *Gelasimus* Latreille, 1817, *Leptuca* Bott, 1973, *Minuca* Bott, 1973, *Paraleptuca* Bott, 1954, *Petruca* Shih, Ng & Christy, 2015, *Tubuca* Bott, 1973 e *Xeruca* Shih, 2015) e Ucidinae (com o gênero *Ucides*) (Shih et al., 2016).

A análise morfológica da ultraestrutura dos espermatozoides em decápodes tem se tornando cada vez mais frequente como uma ferramenta essencial para a compreensão da taxonomia e relações de parentesco entre espécies (Jamieson & Tudge, 2000; Tudge, 2009; Camargo et al., 2016, 2017; Assugeni et al., 2017; Garcia Bento et al., 2018). Informações acerca da ultraestrutura dos espermatozoides em Pinnotheridae é limitada e o que se conhece está relacionado a *Nepinnotheres pinnotheres* (Linnaeus, 1758), *Pinnotheres pisum* (Linnaeus, 1767) (Becker et al., 2013) e *Pinnixa* sp. White, 1846 em Reger (1970). No trabalho de Reger (1970), nota-se o opérculo perfurado, porém a micrografia foi cortada no provável botão apical, além disso, percebe-se possíveis problemas de preservação (Jamieson, 1991; Jamieson & Tudge, 2000). Por outro lado, em Ocypodidae, a morfologia dos espermatozoides foi descrita para um maior número de espécies, a saber: *Tubuca dussumieri* (H. Milne Edwards, 1852) como *Uca dussumieri* e *Ocypode ceratophthalmus* (Pallas, 1772) como *Ocypode ceratophthalma* em Jamieson (1991, 1994), *Afruca tangeri* (Eydoux, 1835) como *Uca tangeri* por Medina (1992), Medina & Rodríguez (1992), *Leptuca pugilator* (Bosc, 1802) como *Uca pugilator* em Jamieson & Tudge (2000), *Ucides cordatus* Linnaeus, 1763 em Matos et al. (2000), *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) em Matos et al. (2001), *Leptuca uruguayensis* (Nobili, 1901) como *Uca uruguayensis* por Cuartas & Sousa (2007), *Leptuca thayeri* (Rathbun, 1900) como *Uca thayeri*, *Minuca vocator* (Herbst, 1804) como *Uca vocator* e *Uca maracoani* (Latreille, 1803) por Benetti et al. (2008).

Apesar das várias descrições ultraestruturais do espermatozoide na literatura, não existem trabalhos que relacionam e comparam a morfologia dos espermatozoides de Pinnotheridae e Ocypodidae, bem como identificam caracteres específicos para tais famílias e suas espécies. Assim, este capítulo tem como objetivo descrever os

espermatozoides dos caranguejos *Dissodactylus crinitichelis* Moreira, 1901, *Austinixa patagoniensis* (Rathbun, 1918), *O. quadrata*, *Minuca mordax* (Smith, 1870) e *U. cordatus* integrado a hipótese filogenética proposta no capítulo I. Tendo em vista a considerável literatura envolvendo a ultraestrutura dos espermatozoides disponível para Pinnotheridae e Ocypodidae, será aqui realizada a padronização da nomenclatura e classificação de caracteres espermáticos chave, e por meio destes buscar entender a evolução morfológica das células germinativas neste grupo irmão de Thoracotremata.

Material e Métodos

Os pinoterídeos *A. patagoniensis* foram manualmente coletados com auxílio de uma bomba de sucção em galerias de *Callichirus major* (Say, 1818) em praias arenosas, durante a maré baixa, nos períodos de 2020 a 2022, no município de Ubatuba (SP). Já os indivíduos de *D. crinitichelis* foram devidamente removidos de bolachas-do-mar *Encope emarginata* (Leske, 1778), por meio de mergulho noturno na Ilha das Couves, no município de Ubatuba (SP), em agosto de 2015. Já os ocipodídeos, além de praias arenosas (*O. quadrata*), foram coletados em regiões estuarinas (*U. cordatus* e *M. mordax*), durante a maré baixa, nos períodos de 2020 a 2022, nos municípios de Ubatuba, Cananéia e Ilha Comprida (SP).

Os animais coletados (n=5 para cada espécie) foram transportados vivos para o laboratório, anestesiados por resfriamento e dissecados. Amostras dos sistemas reprodutores masculino (1mm³) foram submetidos à fixação em Karnovsky (glutaraldeído 2.5% e paraformaldeído 2%) em tampão cacodilato de sódio (pH 7.4), contendo 5% de sacarose por 4 horas (Ro et al., 1990). Posteriormente, as amostras foram submetidas a três banhos em tampão cacodilato de sódio 0.1M (pH 7.4), com duração de 10 minutos cada e em seguida, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por duas horas. Após três lavagens de 10 minutos em tampão, as amostras foram contrastadas “En Bloc” com acetato de uranila 1% (overnight, 4°C). Adesidratação foi realizada em sequência ascendente de acetona (50 a 95%) e as amostras foram incluídas em resina Epon - Araldite. Os cortes semi e ultra-finos foram obtidos no ultra-micrótomo Leica UC7 e as grades contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM – 1010 do Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV, UNESP – Campus de Jaboticabal, operado à 80KV.

O comprimento e largura (C/L) do acrossoma foi mensurado considerando a maior extensão lateral da vesícula acrossomal (para o comprimento) e, a presença do

botão apical e extensão posterior da vesícula (para a largura). A nomenclatura básica utilizada na classificação das estruturas espermáticas seguiu as propostas de Jamieson (1994) e Jamieson & Tudge (2000), enquanto para a morfologia da câmara perforatorial utilizou-se a taxonomia das espécies gregarinas propostas por Clopton (2004).

Análise filogenética e reconstrução ancestral de caráter

A hipótese filogenética considerada neste trabalho foi a proposta no Capítulo I. Desta maneira foi elaborado um diagrama representativo dos dados moleculares obtidos (cladograma) pelos autores por Máxima Verossimilhança (ML – Maximum Likelihood). Apenas as sequências dos representantes de Pinnotheridae e Ocypodidae foram mantidas para a obtenção do cladograma aqui apresentado. O suporte dos ramos, foi demonstrado pelo método de bootstrap ultra-rápido com 1000 réplicas. Posteriormente, foi construída uma matriz contendo os dados morfológicos ultraestruturais dos pinoterídeos e ocipodídeos deste estudo, somados aos disponíveis na literatura, quando possível. Para a matriz, foram selecionadas características ultraestruturais dos espermatozoides que poderiam indicar caracteres sinal para separar as famílias analisadas. Para designar o estado do caractere, foram atribuídos números, como segue: Caráter 1 “Ápice perforatorial com anel menos eletrodenso e região supraopercular”: Ausente (0); Presente (1). Caráter 2 “Anel opercular acessório”: Curto (0); Longo (1). Caráter 3 “Anel xantídeo modificado”: Ausente (0); Presente (1), nas espécies com dados insuficientes, o status atribuído foi o símbolo “?” (Tabela 1). A matriz, juntamente com a árvore gerada por máxima verossimilhança, foi carregada no software Mesquite v.3.7 (Maddison e Maddison, 2021), para a reconstrução da história do caráter pelo critério de parcimônia.

Resultados

Morfologia geral dos espermatozoides

Os espermatozoides de *D. crinitichelis*, *A. patagoniensis*, *O. quadrata*, *M. mordax* e *U. cordatus* exibiram morfologia típica observada em representantes de Thoracotremata. A vesícula acrossomal é esférica ou elíptica, exibindo diferentes zonas acrossomais concêntricas, sendo a vesícula acrossomal quase totalmente envolvida pelo núcleo, característica do polo posterior ou basal, com a presença dos braços radiais delgados. A câmara perforatorial, é preenchida internamente por microtúbulos. Em geral,

o opérculo, localizado no polo anterior ou apical é eletrodenso e perfurado. Na margem do opérculo, na região apical do acrossomo, ocorre a aba periopercular e na margem do material subopercular, encontra-se o anel opercular acessório (Figura 1).

Caracteres ultraestruturais específicos

Família Pinnotheridae

Dissodactylus crinitichelis

O espermatozoide de *D. crinitichelis* exibe núcleo amplo com cromatina fibrosa, além disso, nota-se a presença braços radiais. A vesícula acrossomal é relativamente mais larga do que longa, com razão acrossomal de $0,9 \pm 0,05 \mu\text{m}$, sendo centralmente preenchida pela invaginação do citoplasma subacrossomal formando a câmara perforatorial, com morfologia ovóide (Fig. 1A). No ápice da câmara perforatorial, junto ao material subopercular, ocorre uma área (anel) menos eletrodenso, próximo a unidade de membrana (Fig. 1A - B). O opérculo é centralmente perfurado e o botão apical apresenta forma triangular, se estendendo anteriormente para além da altura das margens laterais do acrossomo. Acima da região opercular, nota-se uma delgada camada, menos eletrodensa que o opérculo, o material supraopercular. Ao redor da margem do opérculo está a aba periopercular e junto a ela nota-se a cápsula percorrendo em sentido posterior ou basal (Fig. 1B - D). Abaixo do opérculo, o material subopercular é menos eletrodenso que o opérculo e mais eletrodenso que as zonas acrossomais. Na margem da região subopercular encontra-se o curto anel opercular acessório com aspecto trilaminar (Fig. 1B). A vesícula acrossomal é formada por três camadas, a interna, intermediária e a externa. A zona acrossomal interna mais eletrodensa que as demais zonas, tem início na região de contato com o material subopercular, estendendo-se até quase a metade anterior da câmara perforatorial. A zona acrossomal intermediária é ligeiramente menos eletrodensa, tendo início na região anterior do anel espessado, na base da câmara perforatorial, estendendo-se em direção ao polo anterior do espermatozoide, em forma de meia lua (Fig. 1D). A zona acrossomal externa é ampla e menos eletrodensa que as demais zonas. Na base da câmara perforatorial, encontra-se o floculado anel espessado eletrodenso em contato com o material eletrolúcido da cápsula, a qual termina na margem anterior do anel espessado (Fig. 1C - D). Os cortes transversais confirmam a morfologia observada em cortes longitudinais, com a presença da câmara perforatorial central e as zonas acrossomais (Fig. 1E e F).

Austinixa patagoniensis

Em corte longitudinal, os espermatozoides de *A. patagoniensis* apresentam núcleo amplo com cromatina fibrosa e braços radiais, no polo basal ou posterior. A vesícula acrossomal é relativamente pequena em relação ao núcleo, sendo mais larga do que longa, com razão acrossomal de $0,9 \pm 0,06 \mu\text{m}$ (Fig. 2A). O opérculo espesso centralmente perfurado está localizado no polo apical ou anterior do espermatozoide e mostra-se saliente em formato triangular em sua porção central (Fig. 2A e B). O botão apical triangular é deslocado anteriormente para além da perfuração opercular e das margens laterais da vesícula acrossomal. Na região acima do opérculo eletrodense, observa-se o material supraopercular, que se mostra como uma estrutura delgada, menos eletrodensa e que acompanha o limite do opérculo (Fig. 2B e C). Abaixo desta estrutura, ocorre o material subopercular, que é ligeiramente menos eletrodense (Fig. 2B). A aba periopercular encontra-se nas margens do opérculo e, abaixo deste, no material subopercular, está o curto anel opercular acessório, trilaminar (Fig. 2B e C). A cápsula acrossomal, região eletrolúcida que envolve o acrossomo, progride desde o botão apical até um terço da base da câmara perforatorial, passando sobre a margem anterior do anel espessado (Fig. 2D). A vesícula acrossomal é formada por três zonas concêntricas, a interna, intermediária e a externa. A zona acrossomal interna é mais eletrodensa que a externa, ocorrendo desde a margem de contato com a região subopercular até quase a metade da altura da câmara perforatorial, sendo separada da zona externa pela zona intermediária (Fig. 2D). A zona acrossomal intermediária, ocorre desde a base da vesícula acrossomal, na margem posterior do anel espessado e progride quase em linha reta em direção ao polo apical, alcançando o material subopercular (Fig. 2D e E). Esta camada é ligeiramente menos eletrodensa que a zona acrossomal interna e mais eletrodensa que a zona externa. O anel espessado floculado eletrodense acompanha a curta base da câmara perforatorial e a cápsula, a qual apresenta material eletrolúcido, ultrapassando em muito a margem do anel espessado (Fig. 2D e E). Em corte transversal próximo ao ápice da câmara perforatorial, observa-se a câmara perforatorial central, a zona acrossomal interna, a intermediária e a externa, enquanto no corte próximo à base, é possível observar apenas a zona acrossomal intermediária e a externa (Fig. 2E e F).

Família Ocypodidae

Ocypode quadrata

Em corte longitudinal, o espermatozoide de *O. quadrata* exhibe polo basal ou posterior com núcleo preenchido com cromatina fibrosa e braços radiais. A vesícula acrossomal é esférica (razão acrossomal de $1, 0 \pm 0, 1$). A câmara perforatorial tem forma estreitamente oblonga, com ápice amplo e arredondado (Fig. 3A). O opérculo é eletrodenso, perfurado centralmente e com margens laterais curvadas e um pequeno botão apical sobre a perfuração. Este botão projeta-se ligeiramente para além da vesícula acrossomal em contato com a porção opercular da cápsula (Fig. 3A e B). Abaixo da região opercular observa-se a região subopercular espessa e menos eletrodensa que o opérculo. Nas margens laterais do acrossomo ocorre o curto anel opercular acessório trilaminar, alcançando a aba periopercular eletrolúcida, quase totalmente recoberta pelo opérculo, onde está a cápsula do acrossomo na vesícula acrossomal (Fig. 3B). A vesícula acrossomal apresenta três zonas concêntricas, sendo a interna eletrodensa, ocorrendo desde a região subopercular até próximo ao início da base perforatorial e próximo à base torna-se mais delgada. A zona acrossomal externa é a maior entre elas, principalmente no volume basal. A zona acrossomal periférica é menos eletrodensa que a externa, bastante volumosa e faz limite com a cápsula delgada e eletrolúcida. Entre as zonas acrossomais interna e externa, observa-se a presença do anel xantídeo modificado eletrodenso, contínuo com anel espessado (Fig. 3C). Na base da câmara perforatorial está o anel espessado eletrodenso e floculado, que tem contato com a cápsula acrossomal, estrutura a qual se estende até a margem anterior do anel espessado (Fig. 3D). A região intermediária da vesícula acrossomal, em corte transversal, confirma a morfologia observada em cortes longitudinais, com a presença da câmara perforatorial, as três zonas acrossomais e o anel xantídeo modificado (Fig. 3E). Na base da câmara perforatorial, nota-se o anel espessado, o espaço da cápsula, onde ele se apoia e as zonas acrossomais intermediária, externa e periférica (Fig. 3F).

Minuca mordax

O espermatozoide de *M. mordax* porta núcleo com cromatina fibrosa e vários braços radiais no polo basal. A vesícula acrossomal é esférica, com razão acrossomal de $1, 0 \pm 0, 1$ e a câmara perforatorial tem formato profundamente obovóide (Fig. 4A). O opérculo, no polo anterior ou apical, é eletrodenso, delgado e forma um domo saliente,

com suas margens centrais mais altas que as margens laterais. No ápice da câmara perforatorial, na região em que se encontra a perfuração opercular, observa-se o botão apical esférico e abaixo da região opercular, nota-se a região subopercular, que é mais espessa, menos eletrodensa que o opérculo (Fig. 4A e B). Próximo às margens laterais da região subopercular ocorre o curto anel opercular acessório e nas margens periféricas do opérculo, observa-se a aba periopercular (Fig. 4B e C). A vesícula acrossomal apresenta três zonas concêntricas, sendo a interna delgada e levemente mais eletrodensa que as demais zonas acrossomais (Fig. 4C). A zona acrossomal externa é a maior das zonas acrossomais e têm aspecto homogêneo e a terceira zona, a periférica, mostra-se bastante delgada e eletrolúcida. O anel xantídeo modificado não está presente entre as camadas acrossomais. Na base da câmara perforatorial, nota-se o anel espessado eletrodense e floculado, que ocorre internamente à delgada cápsula acrossomal. A cápsula termina na margem anterior do anel espessado (Fig. 4C e D). Em cortes transversais, nota-se a câmara perforatorial, as três zonas acrossomais, ausência do anel xantídeo modificado e o anel espessado sobre a cápsula eletrolúcida, na base da câmara perforatorial (Fig. 4E e F).

Ucides cordatus

Em *U. cordatus* os espermatozoides exibem núcleo com braços radiais e cromatina fibrosa, como característica do polo posterior ou basal. A vesícula acrossomal é esferoidal, com razão acrossomal de $1,1 \pm 0,05$ e a câmara perforatorial é estreitamente ovóide (Fig. 5A). Nesta espécie, a câmara perforatorial forma uma acentuada saliência apical, exibindo o opérculo eletrodense, não perfurado e sem botão apical (Fig. 5 A-C). Abaixo da região opercular, observa-se a região subopercular espessa, estriada e menos eletrodensa que o opérculo (Fig. 5C). Próximo às margens laterais da região subopercular ocorre o curto anel opercular acessório e nas margens periféricas, nota-se a aba periopercular (Fig. 5B). A vesícula acrossomal é formada por quatro zonas concêntricas, sendo a interna raiada e a intermediária com aspecto de impressões digitais. A zona acrossomal externa é a maior das zonas acrossomais e menos eletrodensa que as zonas acrossomais intermediária e interna e, apresenta aspecto homogêneo. A última zona, é a acrossomal periférica, a qual mostra-se delgada, eletrolúcida e com margem, em contato com a cápsula, formando uma linha com a mesma eletrodensidade da zona externa do acrossomo (Fig. 5D). Na base da câmara perforatorial, nota-se o anel espessado que também ocorre externamente à cápsula acrossomal eletrolúcida, a qual termina na altura

da margem anterior do anel espessado, ao lado da base da câmara perforatorial. A partir do anel espessado é possível observar o delgado e eletrodenso anel xantídeo modificado, que se estende até a um terço da vesícula acrossomal, terminando antes da metade da câmara perforatorial (Fig. 5E). O corte transversal próximo ao meio da câmara perforatorial, mostra quatro zonas acrossomais e o anel xantídeo modificado (Fig. 5F). Em corte transversal próximo à base da câmara perforatorial nota-se a cápsula acrossomal envolta pelo anel espessado, circundando a base da câmara perforatorial, a qual tem quatro expansões, e as zonas acrossomais intermediária, externa e periférica (Fig. 5G).

Análise filogenética e reconstrução ancestral de caráter

A árvore evolutiva obtida por máxima verossimilhança oferece suporte à monofilia de Pinnotheridae e Ocypodidae, sendo formada por dois clados, com valores de suporte expressos em bootstrap. No primeiro clado, Pinnotheridae é grupo irmão de Ocypodidae. Por sua vez, o clado dos ocipodídeos é formado por dois clados. O primeiro clado agrupa os gêneros *Ocypode*, *Afruca* e *Uca*. Enquanto o segundo clado reúne os gêneros *Tubuca*, *Austruca* e *Gelassimus* como irmãos de *Leptuca* e *Minuca*. O táxon *U. cordatus* foi agrupado em uma posição divergente em relação aos outros táxons do grupo monofilético (Fig. 6).

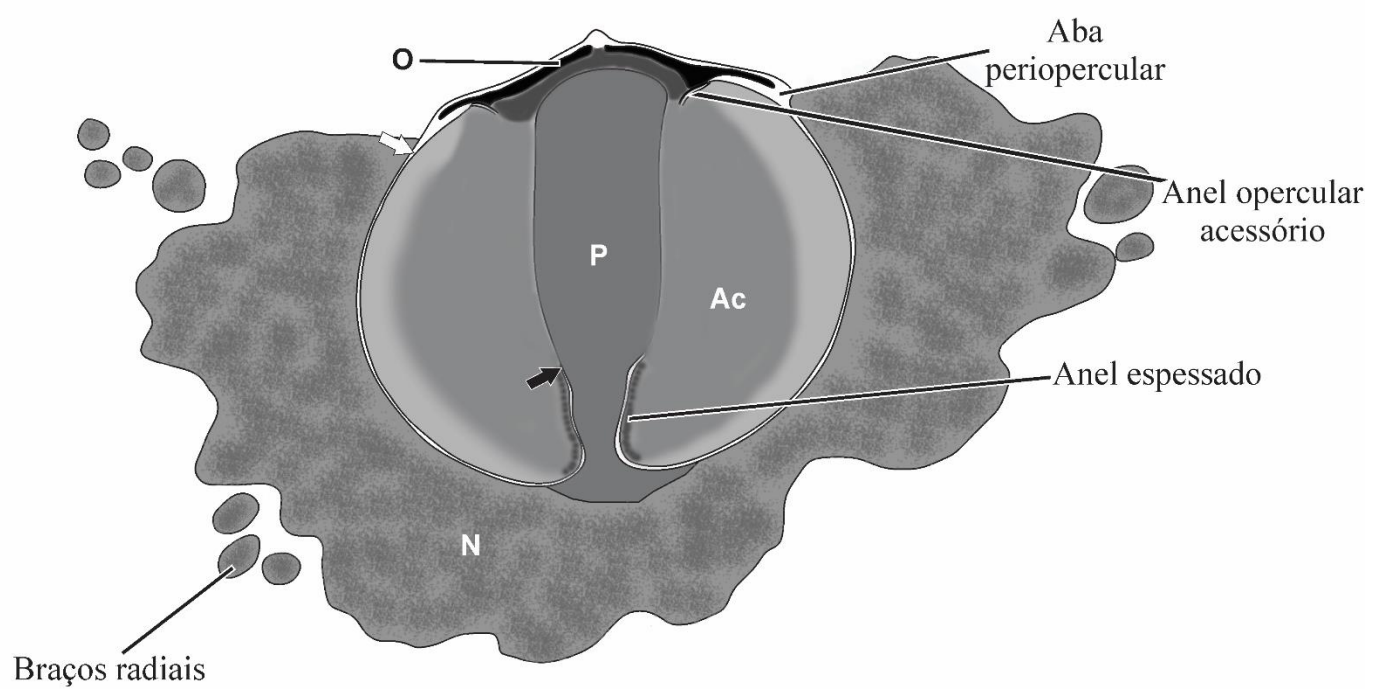
As análises de reconstrução da história ancestral indicaram que os caracteres ápice perforatorial com anel menos eletrodenso, material supraopercular e curto anel opercular acessório são autapomorfias da família Pinnotheridae. Os Ocypodidae compartilham um anel opercular acessório longo, sendo o anel xantídeo modificado comum à *Ocypode* e *Ucides*. A ausência do anel xantídeo modificado é uma plesiomorfia do clado formado por Pinnotheridae e Ocypodidae (Fig. 7 – 9).

Tabela, figuras e legendas

Tabela 1. Matriz com os estados dos caracteres espermáticos, sendo ápice perforatorial com anel menos eletrodenso e região supraopercular (0) ausente e (1) presente, “anel opercular acessório”, sendo (0) curto e (1) longo e “anel xantídeo modificado”, sendo (0) ausente e (1) presente. ?= informações ausentes.

Espécies	Família	Anel menos eletrodenso e região supraopercular	Anel opercular acessório	Anel xantídeo modificado
<i>Dissodactylus crinitichelis</i> ¹	Pinnotheridae	1	0	0
<i>Nepinnotheres affinis</i>		?	?	?
<i>Nepinnotheres pinnotheres</i> ²		1	?	0
<i>Pinnixa cylindrica</i>		?	?	?
<i>Austinixa patagoniensis</i> ¹		1	0	0
<i>Ocypode ceratophthalmus</i> ³	Ocypodidae	0	1	1
<i>Ocypode sinensis</i>		?	?	?
<i>Ocypode quadrata</i> ^{1, 4}		0	?	1
<i>Afruca tangeri</i> ⁵		0	?	0
<i>Uca maracoani</i> ⁶		0	1	0
<i>Tubuca arcuata</i>		?	?	?
<i>Tubuca acuta</i>		?	?	?
<i>Tubuca rhizophorae</i>		?	?	?
<i>Austruca lactea</i>		?	?	?
<i>Austruca annulipes</i>		?	?	?
<i>Gelasimus vocans</i>		?	?	?
<i>Leptuca thayeri</i> ⁶		0	1	0
<i>Minuca vocator</i> ⁶		0	1	0
<i>Minuca mordax</i> ¹		0	1	0
<i>Ucides cordatus</i> ^{1, 7}		0	1	1
<i>Lauridromia dehaani</i>		?	?	?
<i>Conchoecetes artificiosus</i>		?	?	?

¹ Presente estudo; ²Becker et al. (2013); ³Jamieson (1991); ⁴Matos et al. (2001); ⁵Medina (1992); ⁶Benetti et al. (2008); ⁷Matos et al. (2000)

Esquema 1

Esquema 1. Diagrama geral dos caracteres espermáticos compartilhados entre Pinnotheridae e Ocypodidae. Ac= vesícula acrossomal; N= núcleo; O= opérculo; P= câmara perforatorial; Seta branca= início da cápsula acrossomal; Seta preta= final da cápsula acrossomal.

Figura 1

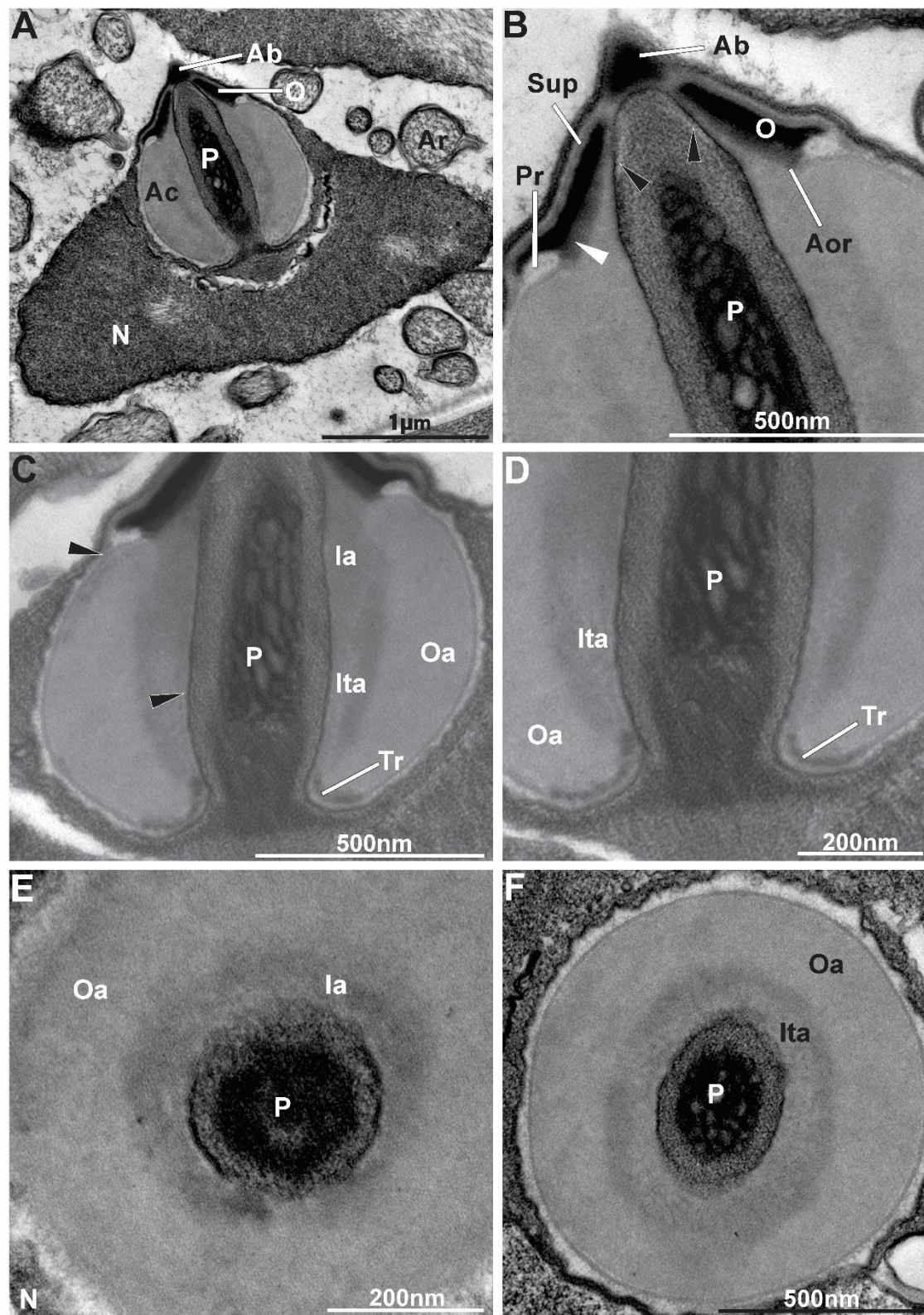


Figura 1. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Dissodactylus crinitichelis*. **A.** Em corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial, nota-se que o espermatozoide é formado pela câmara perforatorial ovóide, vesícula acrossomal, opérculo perfurado e núcleo. Note a presença dos braços radiais. **B.** Detalhe do ápice do acrossomo mostrando o opérculo eletrodenso perfurado, a região supraopercular, a subopercular (cabeça de seta branca), e o botão apical. Observe que esta espécie possui curto anel opercular acessório, aba periopercular e uma área (anel) menos eletrodenso, próximo a unidade de membrana da câmara perforatorial (cabeças de seta preta). **C.** Câmara perforatorial envolvida pela zona acrossomal interna, que tem início na região de contato com o material subopercular. Observe ainda a zona acrossomal intermediária, a externa e a cápsula acrossomal (cabeças de seta) terminando acima da região anterior do anel espessado. **D.** Detalhe da curta base da câmara perforatorial exibindo o anel espessado eletrodenso e floculado. **E.** O corte transversal próximo ao ápice do acrossomo mostrando a câmara perforatorial, envolvida pela zona acrossomal interna e externa. **F.** Em corte transversal próximo a base da câmara perforatorial, mostrando a zona acrossomal intermediária e a externa. Ab= botão apical; Ac= vesícula acrossomal; Aor= anel opercular acessório; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; Ita= zona acrossomal intermediária; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pr= aba periopercular; Sup= região supraopercular; Tr= anel espessado.

Figura 2

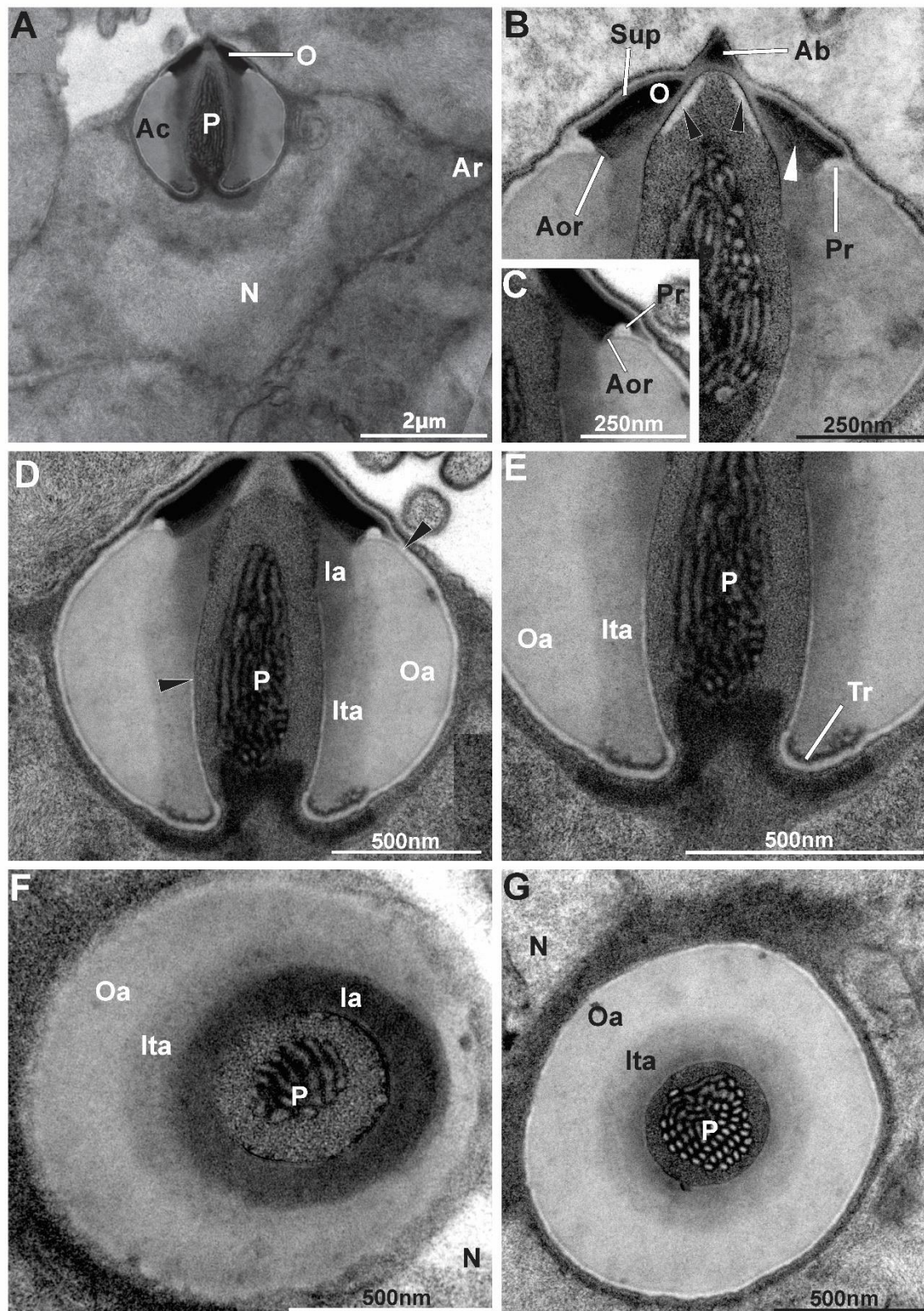


Figura 2. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Austinixa patagoniensis*. **A.** O corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial mostra que o espermatozoide é formado pela câmara perforatorial, vesícula acrossomal, opérculo perfurado e núcleo. **B.** Detalhe do ápice da vesícula acrossomal exibindo o opérculo eletrodense perfurado, região supraopercular, região subopercular (cabeça de seta branca), botão apical triangular, anel opercular acessório curto e aba periopercular. Note o anel eletrolúcido presente no ápice perforatorial (cabeças de seta preta) **C.** Detalhe do curto anel opercular acessório e aba periopercular. **D.** A Câmara perforatorial formada pela zona acrossomal interna eletrodensa. Note ainda a zona acrossomal intermediária, a externa e a cápsula acrossomal (cabeça de seta preta) que termina acima da região anterior do anel espessado. **E.** Detalhe da curta base da câmara perforatorial, exibindo o anel espessado eletrodense e floculado. **F.** Em corte transversal próximo ao ápice da vesícula acrossomal observam-se as zonas acrossomais interna, intermediária e externa. **G.** Em corte transversal próximo a base da vesícula acrossomal, nota-se apenas a zona acrossomal intermediária e a zona externa menos eletrodensa. Ab= botão apical; Ac= vesícula acrossomal; Aor= anel opercular acessório; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; Ita= zona acrossomal intermediária; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pr= aba periopercular; Sup= região supraopercular; Tr= anel espessado.

Figura 3

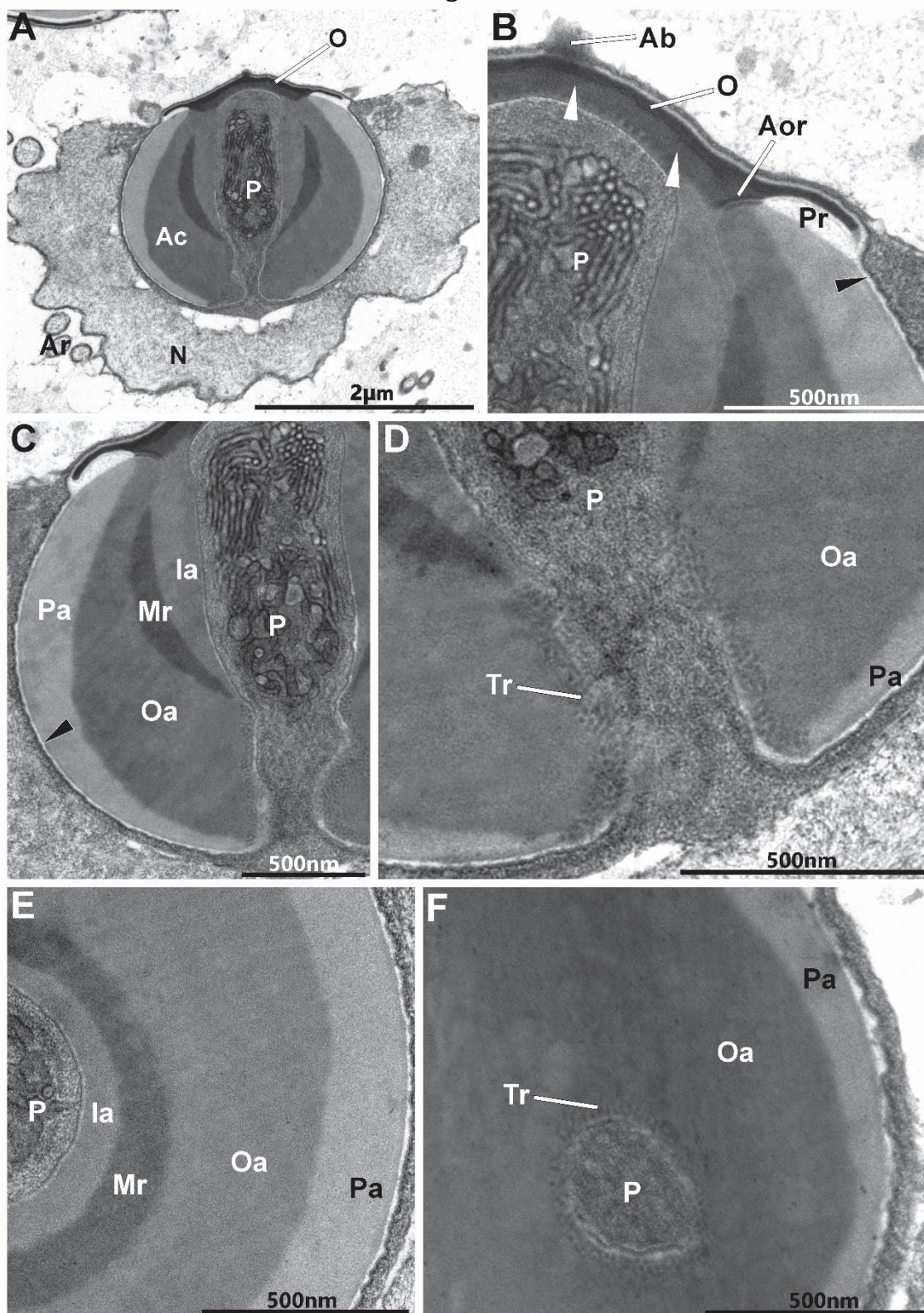


Figura 3. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Ocypode quadrata*. **A.** O corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial exhibe espermatozoide constituído pela vesícula acrossomal, câmara perforatorial, opérculo perfurado e núcleo, com a presença dos braços radiais. **B.** Detalhe do ápice acrossomal, exibindo opérculo eletrodenso e perfurado, região subopercular (cabeças de setas brancas), botão apical, anel opercular acessório e a aba periopercular. Note o início da cápsula acrossomal (cabeça de seta preta). **C.** Câmara perforatorial circundada pela zona acrossomal interna, a qual é adjacente ao anel xantídeo modificado. Nota-se ainda as zonas acrossomais externa e periférica e a cápsula (cabeça de seta). **D.** A base da vesícula acrossomal exhibe o anel espessado, envolvido pela zona acrossomal externa. Observe porções da zona acrossomal periférica. **E.** O corte transversal próximo à região intermediária do acrossomo mostra a câmara perforatorial, zona acrossomal interna, anel xantídeo modificado, zona acrossomal externa e a periférica. **F.** Base da câmara perforatorial circundada pelo anel espessado. Note as zonas acrossomais externa e periférica. Ab= botão apical; Ac= vesícula acrossomal; Aor= anel opercular acessório; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; Mr= anel xantídeo modificado; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Pr= aba periopercular; Tr= anel espessado.

Figura 4

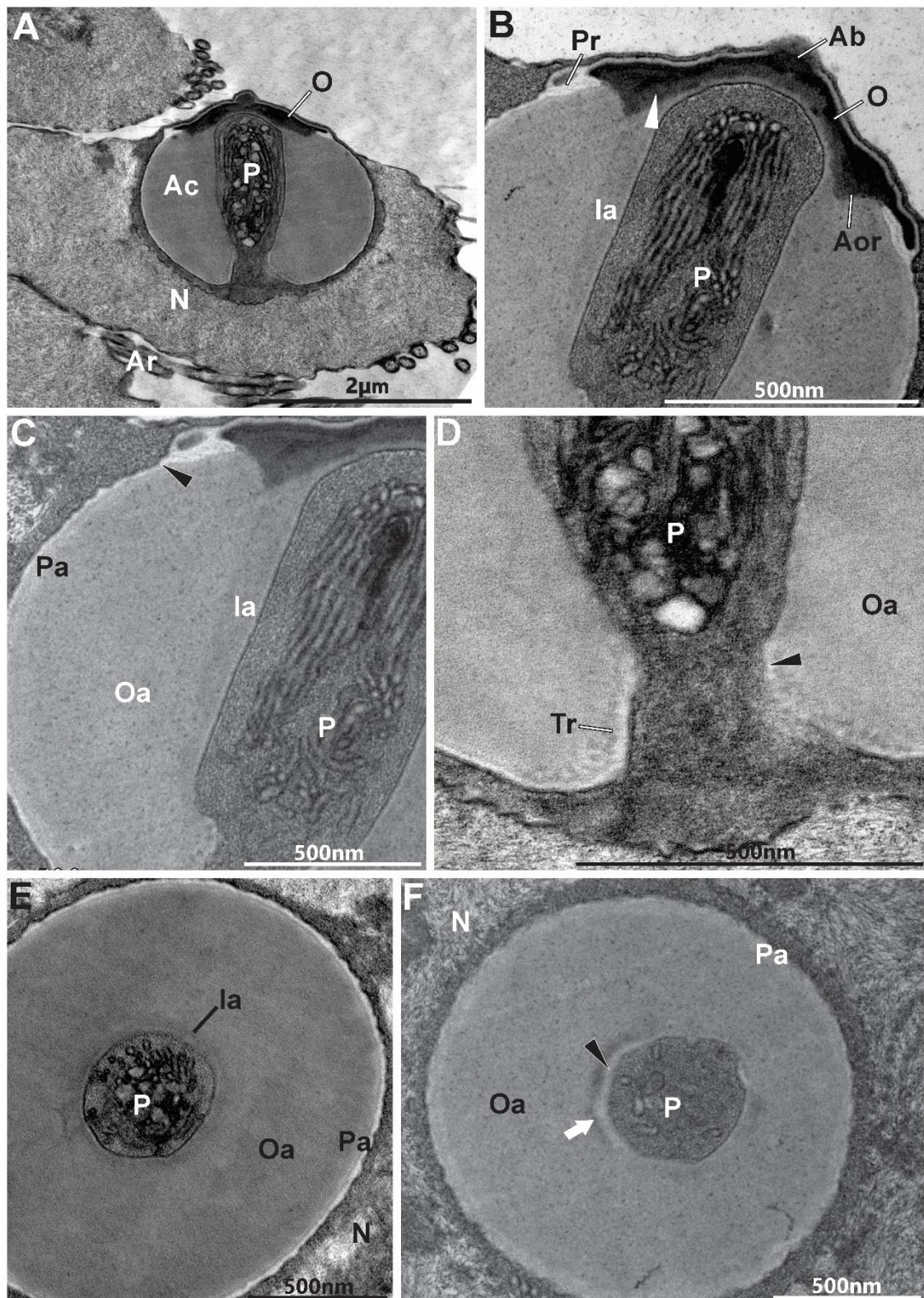


Figura 4. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Minuca mordax*. **A.** Em secção longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial nota-se o espermatozoide formado pela câmara perforatorial, vesícula acrossomal, opérculo perfurado e núcleo. Note os braços radiais. **B.** Ápice da vesícula acrossomal exibindo opérculo eletrodense perfurado, região subopercular (cabeças de setas), discreto anel opercular acessório e o botão apical. Note a presença da aba periopercular. **C.** Câmara perforatorial envolvida pela zona acrossomal interna, seguida pelas zonas acrossomais externa e periférica. Observe o início da cápsula acrossomal (cabeça de seta). **D.** Detalhe da base da câmara perforatorial envolta pela cápsula (cabeça de seta) e anel espessado. Observe ainda porções da zona acrossomal externa. **E.** O corte transversal na região intermediária da vesícula acrossomal exibe a câmara perforatorial central e esférica, circundada pelas zonas acrossomais (interna, externa e periférica). **F.** Em corte transversal na base da vesícula acrossomal observa-se o anel espessado (seta), a cápsula acrossomal (cabeça de seta), as zonas acrossomais e a região nuclear. Ab= botão apical; Ac= vesícula acrossomal; Ar= braços radiais; Aor= anel opercular acessório; Ia= zona acrossomal interna; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Pr= aba periopercular; Tr= anel espessado.

Figura 5

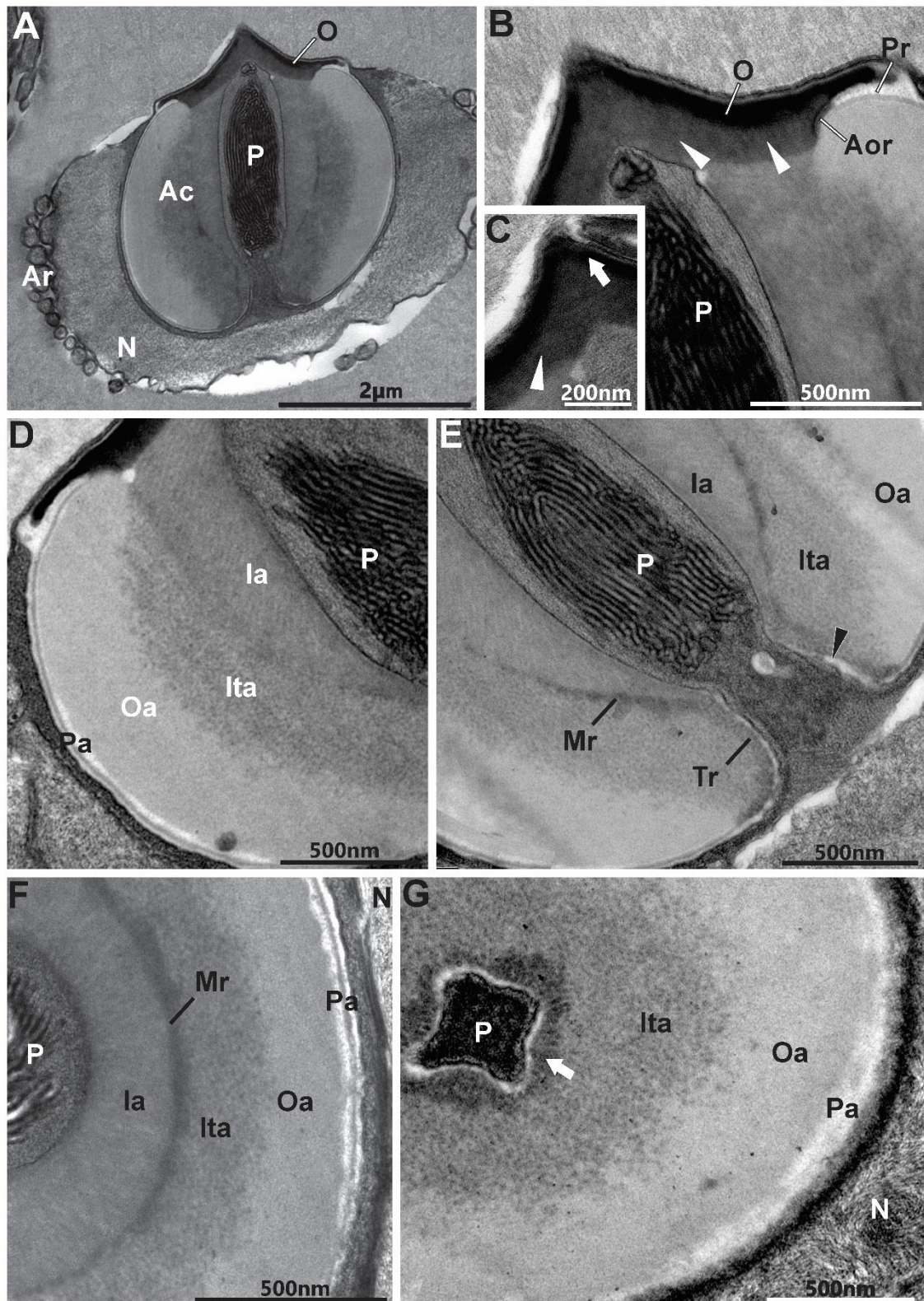


Figura 5. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Ucides cordatus*. **A.** Em corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial nota-se que o espermatozoide é constituído pela vesícula acrossomal, câmara perforatorial, opérculo perfurado e núcleo, com a presença dos braços radiais. **B.** Detalhe do ápice acrossomal, exibindo opérculo eletrodenso e não perfurado, região subopercular (cabeças de setas), anel opercular acessório e a aba periopercular. **C.** Opérculo não perfurado (seta) e região subopercular (cabeça de seta). **D.** Câmara perforatorial circundada pela zona acrossomal interna, seguida pelas zonas intermediária, externa e periférica. Note que a zona acrossomal interna é raiada e que a intermediária mostra morfologia de impressões digitais. **E.** Detalhe da base do acrossoma mostrando a cápsula (cabeça de seta) e o anel espessado, seguido pelas zonas acrossomais intermediária e externa. Observe o anel xantídeo modificado bastante delgado, localizado entre as zonas acrossomais interna e intermediária. **F.** Detalhe do corte transversal próximo à região intermediária do acrossomo mostrando a câmara perforatorial, zona acrossomal interna, anel xantídeo modificado bastante delgado, zona acrossomal intermediária, externa e a periférica. **G.** Detalhe do corte transversal próximo à base do acrossomo exibindo o anel espessado (seta) que envolve a base da câmara perforatorial. Nota-se ainda as zonas acrossomais intermediária, externa e a periférica. Ac= vesícula acrossomal; Aor= anel opercular acessório; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; Ita= zona acrossomal intermediária; Mr= anel xantídeo modificado; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Pr= aba periopercular; Tr= anel espessado.

Figura 6

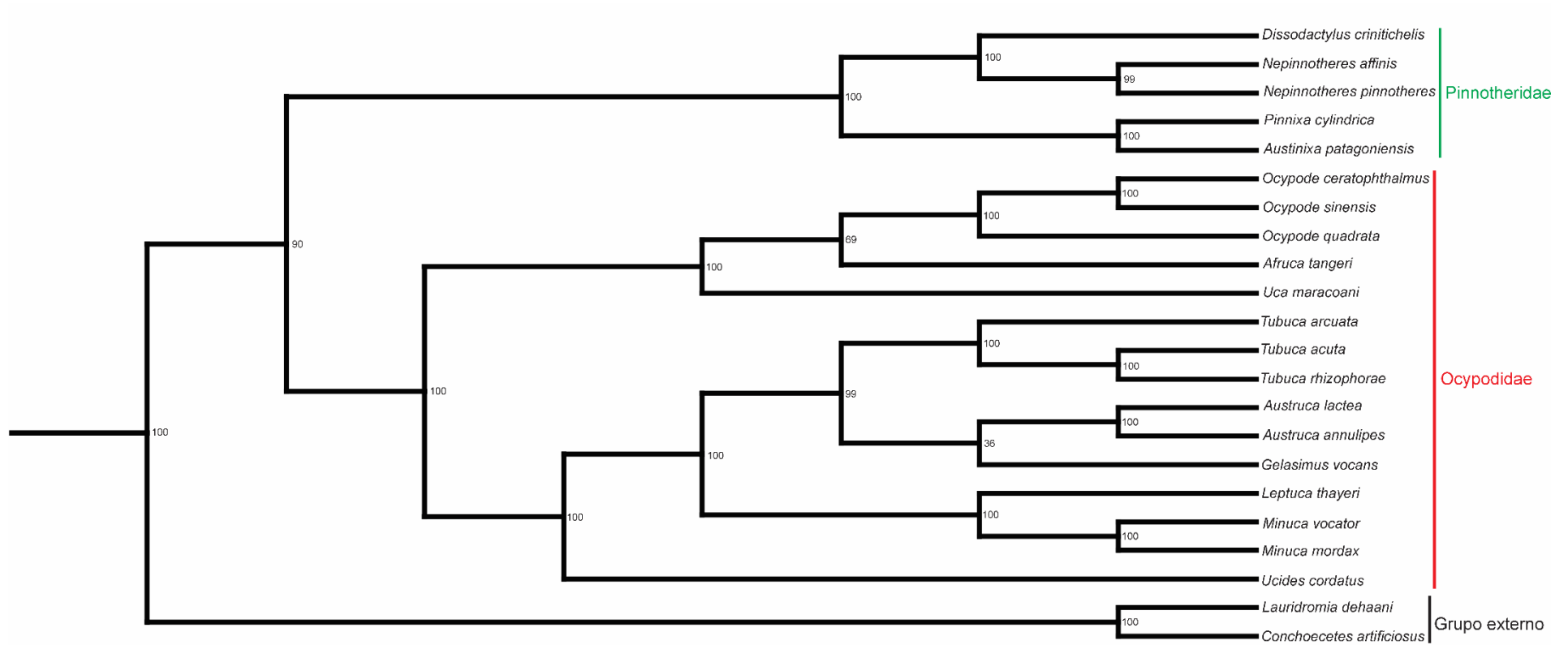


Figura 6. Cladograma das famílias Pinnotheridae e Ocypodidae, obtido a partir da Máxima verossimilhança. O suporte de clado está representado por bootstrap.

Figura 7

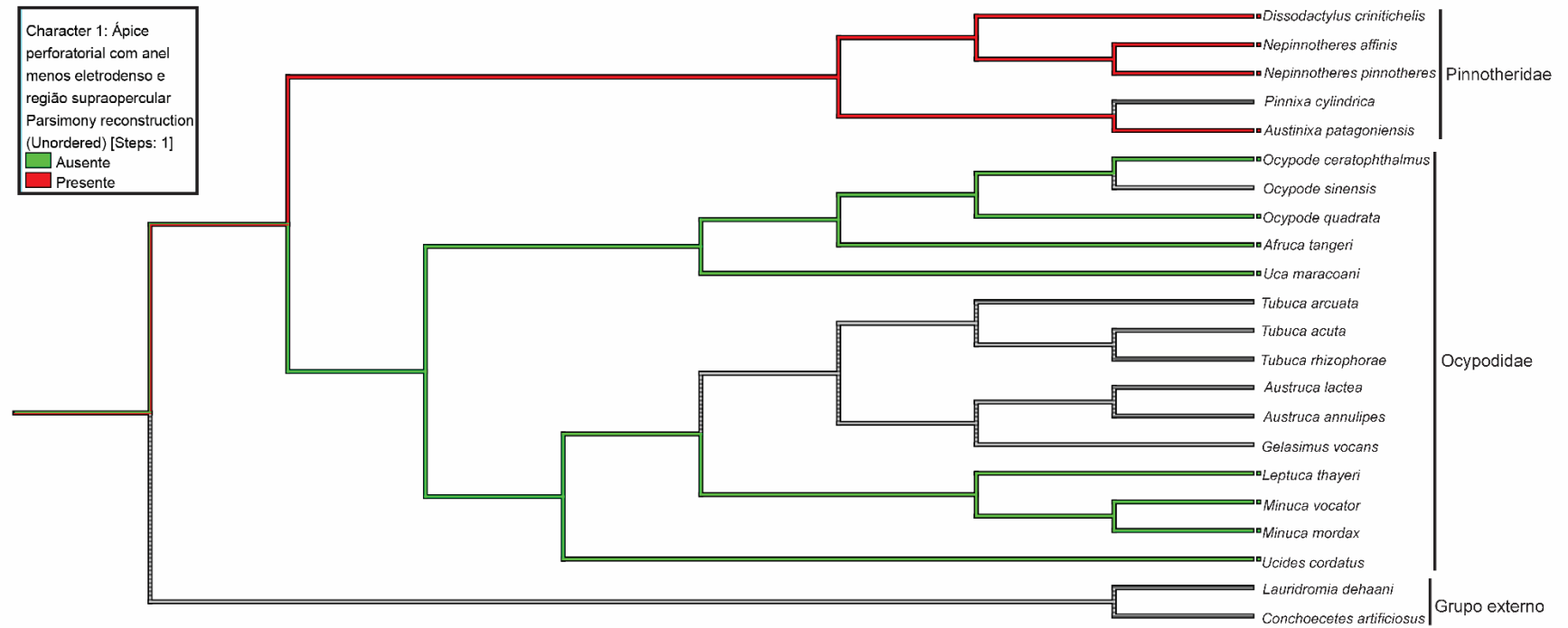


Figura 7. Mapeamento dos caracteres “Ápice perforatorial com anel menos eletrodenso” e “região supraopercular” em Pinnotheridae e Ocypodidae. Este cladograma mostra a reconstrução de estado ancestral dos caracteres “ápice perforatorial” e “região supraopercular”, sendo que em verde estes caracteres estão ausentes e em vermelho presentes. O ancestral comum do clado poderia ou não apresentar ambos caracteres analisados, porém, são comuns aos Pinnotheridae.

Figura 8

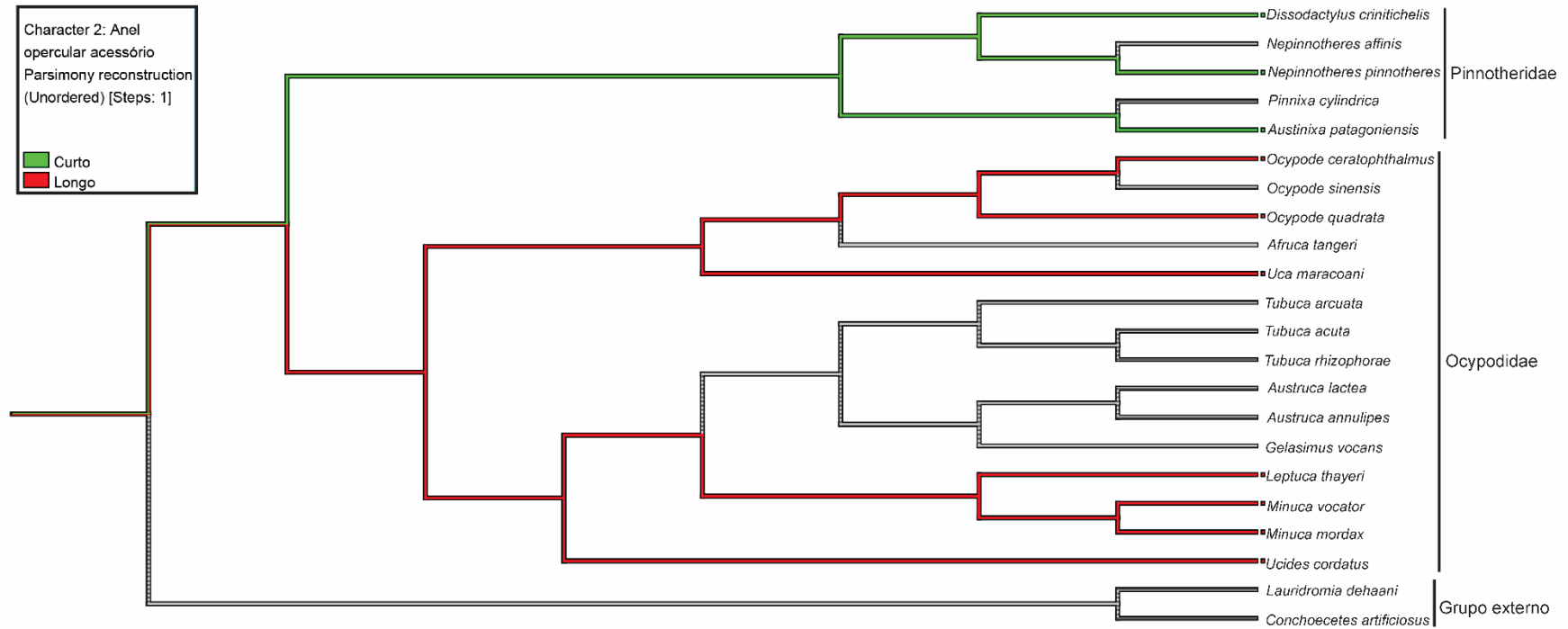


Figura 8. Mapeamento do caráter “Anel opercular acessório”. Este cladograma representa a reconstrução ancestral do caráter “anel opercular acessório”, evidenciando em verde uma estrutura curta e em vermelho longo. Note que o anel opercular acessório curto é uma das sinapomorfias de Pinnotheridae, enquanto uma estrutura longa é compartilhada entre os Ocypodidae.

Figura 9

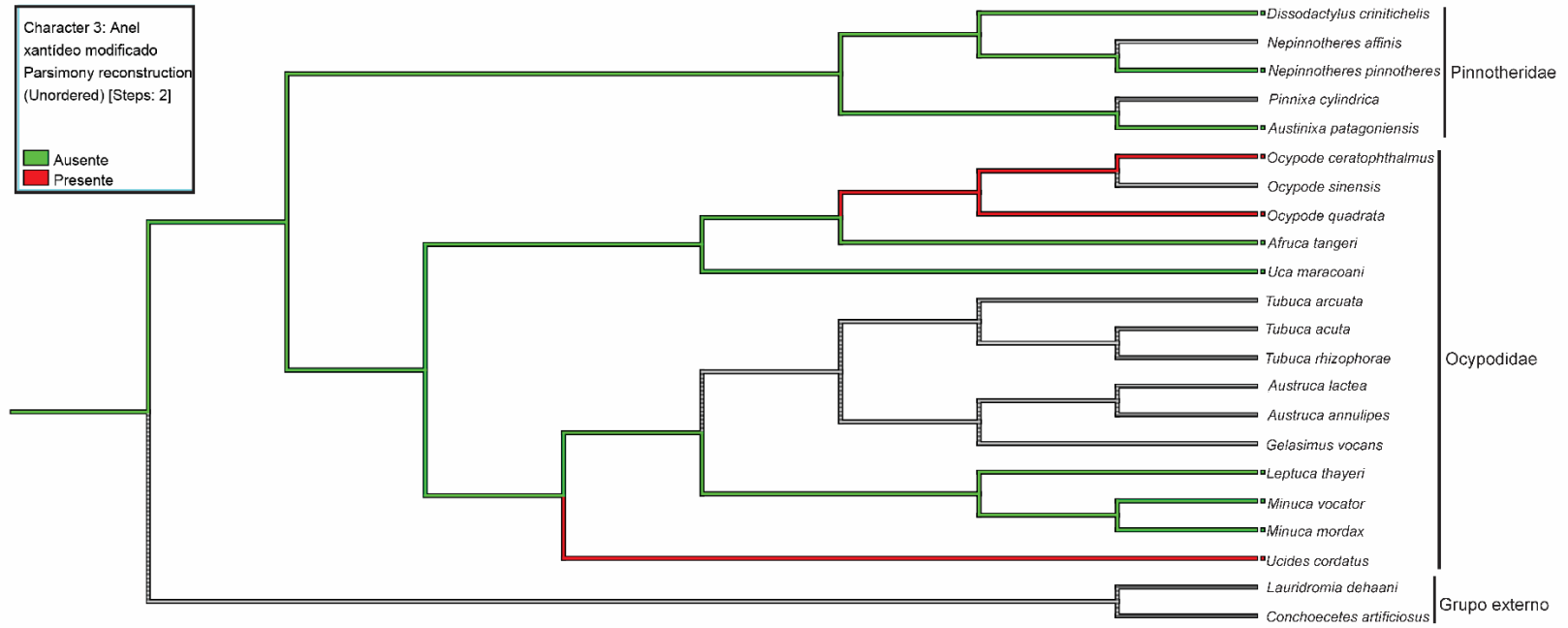


Figura 9. Mapeamento do caráter “Anel xantídeo modificado”. Cladograma representando a reconstrução do caráter “anel xantídeo modificado”. Em verde, esta estrutura é ausente e em vermelho está presente. A ausência do anel xantídeo é uma plesiomorfia de Pinnotheridae e Ocypodidae, sendo este caráter presente como autapomorfias em *Ocypode* e *Ucides*.

Discussão

Os espermatozoides dos pinoterídeos *D. crinitichelis*, *A. patagoniensis* e ocipodídeos *O. quadrata*, *M. mordax* e *U. cordatus* compartilham características gerais comumente observadas em Thoracotremata. Essas características incluem a presença de espermatozoides com vesícula acrossomal, formada por zonas acrossomais concêntricas, anel espessado eletrodenso e um núcleo formado por cromatina, com a presença dos braços radiais (Jamieson, 1991, 1994; Jamieson & Tudge, 2000). Entretanto, observam-se diferenças importantes na ocorrência de alguns caracteres espermáticos, os quais normalmente são observados em Thoracotremata, principalmente entre os representantes de Ocypodidae. Um exemplo destas características distintas, é a presença de um opérculo contínuo, sem perfuração central, observado em *U. cordatus*. Este padrão opercular é compartilhado com o Macrophthalmidae Dana, 1851 *Macrophthalmus* (*macrophthalmus*) *crassipes* H. Milne Edwards, 1852 em Jamieson (1991, 1994) e, também com um único representante de Ocypodidae, *L. thayeri* em Benetti et al. (2008). Em geral, o que normalmente se observa entre os representantes desta família é a presença de um opérculo centralmente perfurado, o qual é comum à Pinnotheridae, outras espécies de Ocypodidae, Varunidae H. Milne Edwards, 1853, Grapsidae MacLeay, 1838, Sesarmidae Dana, 1851 e Gecarcinidae MacLeay, 1838 (Jamieson, 1991; Jamieson, 1994; Jamieson et al., 1996; Benetti et al., 2008, 2013; Becker et al., 2013; Tiseo et al., 2017). Assim, apresentar opérculo nos espermatozoides perfurado pode ser considerado uma sinapomorfia de Thoracotremata.

Os espermatozoides das espécies de Pinnotheridae *D. crinitichelis* e *A. patagoniensis* possuem características semelhantes, como a presença da aba periopercular, vesícula acrossomal composta por três zonas acrossomais concêntricas e uma câmara perforatorial ovóide, com base curta e um anel apical eletrolúcido no ápice da câmara perforatorial. Além disso, ambas as espécies possuem características exclusivas, como material supraopercular, um anel opercular acessório curto e uma cápsula acrossomal que se estende além das margens anteriores do anel espessado e um distinto botão apical triangular deslocado anteriormente para além da perfuração opercular. As únicas diferenças observadas entre as duas espécies são relacionadas à morfologia da câmara perforatorial e da zona acrossomal intermediária, as quais podem ser apomorfias para o grupo. Em *D. crinitichelis*, a câmara perforatorial é estreita, enquanto em *A. patagoniensis* esta estrutura é ligeiramente mais ampla. Por sua vez, a zona acrossomal intermediária em *D. crinitichelis* tem início na região anterior do anel

espessado, e se estende em direção ao ápice do acrossomo, formando uma estrutura finamente recurvada. Em *A. patagoniensis*, essa zona começa na base da câmara perforatorial, estendendo-se em direção ao ápice da vesícula acrossomal. Esta zona tem estrutura geral retilínea e termina na margem do curto anel opercular acessório.

Os ocipodídeos *O. quadrata* e *U. cordatus* tiveram a ultraestrutura dos espermatozoides descritas anteriormente por Matos et al. (2000, 2001). Porém, figuras com maior detalhamento foram utilizadas no presente estudo, possibilitando abranger o conhecimento e caracterizar os caracteres espermáticos de forma mais aprofundada. A comparação dos espermatozoides das duas espécies supracitadas entre *M. mordax*, indica diferenças em relação ao opérculo, botão apical, presença da zona acrossomal raiada, anel xantídeo modificado, morfologia da câmara, ápice perforatorial e zonas acrossomais. Em *O. quadrata* e *M. mordax* o opérculo é perfurado, com a presença do botão apical, enquanto em *U. cordatus*, o opérculo é contínuo, sem perfuração e o botão apical está ausente. Nas demais espécies aqui estudadas, o opérculo mostra-se perfurado, com a presença do botão apical. Nos Thoracotremata descritos na literatura científica, apenas os representantes da família Macrophthalmidae e *L. thayeri* parecem apresentar opérculo imperfurado e a ausência do botão apical, o que sugere que estas podem ser características homoplásticas compartilhadas entre os Ocypodidae e Macrophthalmidae (Jamieson, 1994). O anel xantídeo modificado, que ocorre a partir da região anterior do anel espessado, foi observado em *O. quadrata* e *U. cordatus*, porém, este apresenta um aspecto mais delgado em *U. cordatus*. Além disso, somente *U. cordatus* entre os ocipodídeos estudados, apresentou quatro zonas acrossomais, incluindo a zona acrossomal raiada e a intermediária, a qual exibe uma figura semelhante a impressões digitais. Em relação à morfologia da câmara perforatorial, *O. quadrata* é do tipo oblonga, *M. mordax* é profundamente obovóide e *U. cordatus* é estreitamente ovóide. Adicionalmente, apenas em *U. cordatus*, o ápice da câmara perforatorial é estreito e arredondado, enquanto nas demais espécies ele é largo e arredondado. Jamieson & Tudge (2000) descreveram a ausência da zona acrossomal raiada foi descrita como uma das sinapomorfias de Thoracotremata. Entretanto, sua presença em *U. cordatus*, em adição à presença da zona acrossomal intermediária, com figura semelhante a impressões digitais, podem ser consideradas autapomorfias da espécie.

Entre os Pinnotheridae, poucos estudos na literatura abordaram a ultraestrutura dos espermatozoides. O conhecimento nessa área é restrito a poucos estudos mais detalhados realizado para duas espécies: *N. pinnotheres* e *P. pisum* realizados por Becker

et al. (2013) e *Pinnixa* sp. por Reger (1970). Ao comparar os espermatozoides de *D. crinitichelis* e *A. patagoniensis* com as espécies previamente descritas na literatura, foi observada uma grande similaridade ultraestrutural. Todas as espécies analisadas apresentaram material supraopercular, anel opercular acessório curto e a margem apical da câmara perforatorial com margem eletrolúcida, sugerindo que essas características podem ser autapomorfias da família. As únicas diferenças específicas referem-se à morfologia da aba periopercular e ao número de zonas acrossomais. Em *D. crinitichelis*, *A. patagoniensis* e *P. pisum*, a aba periopercular está localizada nas margens laterais inferiores do opérculo. Devido a essa posição, a mesma estrutura foi classificada em *P. pisum* como aba subopercular. No entanto, para seguir as classificações gerais de Brachyura (Jamieson, 1991; 1994), será mantido apenas o uso do termo "aba periopercular". A aba periopercular em *N. pinnotheres* é mais saliente em comparação com as outras espécies mencionadas. Em relação ao número de zonas acrossomais, observa-se que *D. crinitichelis*, *A. patagoniensis* e *N. pinnotheres* apresentam três zonas acrossomais, enquanto em *Pinnixa* sp. e *P. pisum* foram observadas apenas duas zonas. Estes resultados indicam que o ancestral dos pinoterídeos provavelmente possuía uma vesícula acrossomal composta por três zonas acrossomais e a aba periopercular.

Quando os espermatozoides dos Ocypodidae do presente estudo foram comparados com os previamente descritos na literatura para caranguejos chama-maré [*T. dussumieri*, *O. ceratophthalmus* (Jamieson, 1991, 1994), *A. tangeri* (Medina & Rodríguez, 1992), *L. uruguayensis* (Cuartas & Sousa, 2007), *U. maracoani*, *L. thayeri* e *M. vocator* (Benetti et al., 2008)] observou-se que os caranguejos violinistas exibem morfologia similar, sendo que as únicas diferenças verificadas foram a ausência do botão apical, observada em *L. thayeri* e a morfologia da zona acrossomal interna, sendo estreita e reta em *M. mordax*, ampla e curvada em *A. tangeri*, *L. thayeri* e *U. maracoani*, e estreita e curvada nas demais espécies comparadas. *Ocypode quadrata* e *O. ceratophthalmus* também possuem morfologia espermática semelhante, sendo que as diferenças observadas são referentes à morfologia da zona acrossomal interna, que se mostra ampla e curvada em *O. quadrata* e estreita e reta em *O. ceratophthalmus*. Além disso, as lamelas concêntricas da zona acrossomal externa foram observadas apenas em *O. ceratophthalmus* (Jamieson, 1991, 1994), demonstrando ser uma apomorfia específica. Apesar de possuir uma morfologia distinta, o anel xantídeo modificado foi característico em *Ocypode* e *Ucides*, aqui descritos pela primeira vez, uma vez que estas estruturas não foram apresentadas ou detalhadas nas descrições dos espermatozoides realizadas por

Matos et al. (2000, 2001). No entanto, não foi observado em *M. mordax* e outros caranguejos violinistas descritos na literatura (Jamieson, 1991, 1994; Benetti et al., 2008). Em relação às outras famílias de Thoracotremata, o anel xantídeo modificado está presente no Mictyridae Dana, 1851 *Mictyris longicarpus* Latreille, 1806 e nos Gecarcinidae do gênero *Cardisoma* Latreille in Latreille, Le Peletier, Serville & Guérin, 1828 (Jamieson et al., 1996; Benetti et al., 2013). Além disso, Jamieson (1994) sugeriu que pelo menos um representante de Grapsidae também possa apresentar essa estrutura. Na verdade, ela foi descrita como camada dois do acrossomo de *Pachygrapsus transversus* (Gibbes, 1850), *Pachygrapsus gracilis* (de Saussure, 1857) e *Geograpsus lividus* (H. Milne Edwards, 1837) por Tiseo et al. (2017). Desta maneira, uma revisão desta família empregando mais espécies, se faz necessário. De qualquer maneira, sugere-se que o caráter anel xantídeo possa ser uma plesiomorfia de Thoracotremata.

O cladograma apresentado neste estudo indicou que a família Pinnotheridae é monofilética, compartilhando um ancestral comum com representantes da família Ocypodidae. Além disso, a análise da ultraestrutura dos espermatozoides de ambas as famílias revelou a presença de caracteres semelhantes, como três zonas acrossomais, perfuração opercular, botão apical, anel opercular acessório, aba periopercular e anel espessado eletrodenso. Estes caracteres podem ser considerados plesiomórficos do clado, apesar da presença de vários caracteres divergentes, principalmente em *O. quadrata* e *U. cordatus*, tais como o anel xantídeo modificado espesso ou delgado e a presença de um opérculo perfurado ou imperfurado. Os resultados filogenéticos do presente estudo são semelhantes aos apresentados por Tsang et al. (2022), que também demonstram a proximidade entre os representantes da família Pinnotheridae e Ocypodidae. No entanto, o mesmo trabalho indica a proximidade de ambas as famílias aos representantes de Cryptochiridae na filogenia de Thoracotremata. Apesar dessa família não ter sido incluída na análise filogenética do presente estudo, a filogenia completa dos Thoracotremata, apresentada no capítulo I, demonstrou que os táxons de Pinnotheridae, Ocypodidae e Cryptochiridae são mais distantes. O estudo ultraestrutural dos espermatozoides dos Cryptochiridae *Cryptochirus coralliodytes* Heller, 1860 e *Hapalocarcinus marsupialis* Stimpson, 1859 realizado por Jamieson & Tudge (2000), os incluiu em Heterotremata, devido ao compartilhamento da orientação oblíqua do anel opercular acessório e uma zona acrossomal presente nas margens perforatorias, descrita como equivalente a zona acrossomal raiada. Porém, os mesmos autores indicaram alguns caracteres comuns a Thoracotremata, como a aba periopercular, observada em *C. coralliodytes* e o botão apical

presente em *H. marsupialis*. De acordo com a literatura científica, a ultraestrutura dos espermatozoides revela certa ambiguidade em relação à classificação dos criptoquirídeos como pertencentes aos grupos Thoracotremata ou Heterotremata (Van der Meij & Schubart, 2014; Tudge et al., 2014). Desta forma, é necessário realizar estudos mais detalhados sobre a ultraestrutura dos espermatozoides em um número maior de espécies da família para confirmar se a sua estrutura é consistente com a classificação de Cryptochiridae dentro de Thoracotremata, como sugerido pelos estudos de filogenia molecular (Tsang et al., 2014, 2022; Sun et al., 2022).

Em relação aos representantes da família Ocypodidae, Shih et al. (2016) propuseram que o gênero *Ucides* seja incluído em uma subfamília denominada Ucidinae, porém, mantendo-o ainda na família Ocypodidae. Algumas diferenças, como a presença de um opérculo imperfurado, a ausência do botão apical, a existência de um anel xantídeo delgado e a zona acrossomal raiada, bem como a zona acrossomal intermediária, com aspecto semelhante a impressões digitais, observadas em *U. cordatus*, juntamente com as diferenças morfológicas corporais descritas por Ng et al. (2008), sugerem que *Ucides* seria mais apropriadamente incluído em Ucididae, ou seja, uma família separada. Porém, a análise filogenética molecular, mais as características ímpares do espermatozoide observadas na presente tese, posiciona *Ucides* no clado dos Ocypodidae. Dessa forma, concordamos com a proposição de Shih et al. (2016), que é mais adequado considerar a espécie como uma subfamília separada (Ucidinae), mas ainda mantendo-a dentro da família Ocypodidae e que as diferenças espermáticas observadas podem ser reflexos às mudanças oriundas de uma evolução convergente.

Em conclusão, a análise da ultraestrutura dos espermatozoides e a presença de alguns caracteres variáveis, como a presença do material supraopercular, um curto anel opercular acessório e a área marginal eletrolúcida formando um anel apical da câmara perforatorial são úteis para distinguir as espécies de Pinnotheridae de outros representantes de Thoracotremata e foram aqui consideradas como autapomorfias da família. Adicionalmente, este estudo demonstrou que as espécies de Ocypodidae, que de acordo com análises filogenéticas moleculares compartilham um ancestral comum próximo, podem apresentar vários caracteres divergentes, que parecem ser melhores agrupados por subfamília em vez de característica únicas para a família. Assim, o opérculo perfurado ou contínuo, com botão apical e três camadas acrossomais ocorrem nas subfamílias Ocypodinae, Gelasiminae e Ucidinae. O anel xantídeo modificado é compartilhado por Ocypodinae e Ucidinae, sendo que em Ucidinae a presença de quatro

zonas acrossomais, camada acrossomal interna raiada, opérculo não perfurado e sem botão apical são únicas inclusive para a vasta maioria dos Thoracotremata.

Referências bibliográficas

- Assugeni, C. 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(12), 1628–1646. <https://doi.org/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(1), 12-26.
- 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(11), 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>
- Benetti, A. S., Tavares, M., Carvalho dos Santos, D., & Tudge, C. (2013). Ultrastructure of the spermatophores and spermatozoa from the gecarcinid land crab, *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1828, (Crustacea, Brachyura, Gecarcinidae) from the western Atlantic. *Invertebrate Reproduction & Development*, 57(1), 61-69. <https://doi.org/10.1080/07924259.2012.666506>
- 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(1), 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>
- Castro, P. (2015). Symbiotic brachyura. In *Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea, Volume 9 Part C (2 vols)* (pp. 543-581). Brill.

- Clopton, R. E. (2004). Standard Nomenclature and Metrics of Plane Shapes for Use in Gregarine Taxonomy. *Comparative Parasitology*, 71(2), 130–140.
<https://doi.org/10.1654/4151>
- Cuartas, E., & Sousa, L. (2007). Ultrastructural study of spermatophores and spermatozoa in *Uca uruguayensis* (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). *Biociências*, 15(1), 21–28.
- Davie, P. J. F., Guinot, D., & Ng, P. K. L. (2015). Systematics and classification of Brachyura. In *Treatise on Zoology - Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea, Volume 9 Part C (2 vols)* (pp. 1049–1130). BRILL.
https://doi.org/10.1163/9789004190832_021
- de Gier, W., & Becker, C. (2020). A review of the ecomorphology of pinnotherine pea crabs (Brachyura: Pinnotheridae), with an updated list of symbiont-host associations. *Diversity*, 12(11), 431. <https://doi.org/10.3390/d12110431>
- 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>
- Guinot, D. (1977). Propositions pour une nouvelle classification des Crustacés Décapodes Brachyours. Comptes rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances de l'Academie Des Sciences*, 1049–1052.
- Hultgren, K. M., Foxx, C. L., & Palacios Theil, E. (2022). Host-associated morphological convergence in symbiotic pea crabs. *Evolutionary Ecology*, 36(2), 273–286.
<https://doi.org/10.1007/s10682-022-10153-0>
- Jamieson, B. G. M. (1991). Ultrastructure and phylogeny of Crustacean spermatozoa. *Memoirs of the Queensland Museum*, 31, 109–142.
- Jamieson, B. G. (1994). Phylogeny of the Brachyura with particular reference to the Podotremata: evidence from a review of spermatozoal ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 345(1314), 373–393. <https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0116>
- Jamieson, B. G. M., Guinot, D., & Forges, B. R. (1996). Contrasting spermatozoal ultrastructure in two thoracotreme crabs, *Cardisoma carnifex* (Gecarcinidae) and *Varunu litterata* (Grapsidae) (Crustacea: Brachyura). *Invertebrate Reproduction*

- & *Development*, 29(2), 111-126.
<https://doi.org/10.1080/07924259.1996.9672503>
- Jamieson, B. G. M., & Tudge, C. C. (2000). 1. *Crustacea-Decapoda*. In: Jamieson, B.G.M. (Ed.), *Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny*, (pp. 1–95).
- Kitaura, J., Wada, K., & Nishida, M. (2002). Molecular phylogeny of grapsoid and ocypodoid crabs with special reference to the genera *Metaplex* and *Macrophthalmus*. *Journal of Crustacean Biology*, 22(3), 682–693.
<https://doi.org/10.1163/20021975-99990281>
- Maddison, W. P. and D.R. Maddison. 2021. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.7.
- Matos, E., Matos, P., Corral, L., & Azevedo, C. (2000). Ultraestrutura do espermatozóide de *Ucides cordatus* Linnaeus (Crustacea, Ocypodidae) do litoral norte do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 17(3), 753–756. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752000000300020>
- Matos, E. R., Santos, M. N. S., Corral, L., & Azevedo, C. (2001). Ultra-estrutura do espermatozóide de *Ocypode quadrata* Fabricius, 1787 (Crustacea, Ocypodidae) do litoral norte do Brasil. *Revista de Ciências Agrárias-Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 36, 131–135.
- Medina, A. (1992). Structural modifications of sperm from the fiddler crab *Uca tangeri* (Decapoda) during early stages of fertilization. *Journal of crustacean Biology*, 12(4), 610-614. <https://doi.org/10.1163/193724092X00085>
- Medina, A., & Rodríguez, A. (1992). Spermiogenesis and sperm structure in the crab *Uca tangeri* (Crustacea, Brachyura), with special reference to the acrosome differentiation. *Zoomorphology*, 111(3), 161–165.
<https://doi.org/10.1007/BF01632905>
- Ng, P. K., Daniele Guinot, & Peter JF Davie. (2008). Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 17, 1–286.
- 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*.

- Reger, J. F. (1970). Studies on the fine structure of spermatids and spermatozoa of the crab, *Pinnixia* sp. *Journal of Morphology*, 132(1), 89-99. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051320106>
- Ro, S., Talbot, P., Leung-Trujillo, J., & Lawrence, A. L. (1990). Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: segments 1–3. *Journal of Crustacean Biology*, 10(3), 455-468. <https://doi.org/10.2307/1548335>
- 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>
- Shih, H. T., Ng, P. K., Davie, P. J., Schubart, C. D., Türkay, M., Naderloo, R., ... & Liu, M. Y. (2016). Systematics of the family Ocypodidae Rafinesque, 1815 (Crustacea: Brachyura), Based on phylogenetic relationships, With a reorganization of subfamily rankings and a review of the taxonomic status of *Uca* Leach, 1814, *Sensu lato* and its subgenera. *Raffles Bulletin of Zoology*, 64, 139–175.
- Sun, S. E., Jiang, W., Yuan, Z., & Sha, Z. (2022). Mitogenomes provide insights into the evolution of Thoracotremata (Brachyura: Eubrachyura). *Frontiers in Marine Science*, 9, 848203. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.848203>
- 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*, 269, 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2017.07.002>
- Theil, E. P., & Felder, D. L. (2020). Phylogeny of the genus *Pinnixa* White, 1846 (Crustacea, Brachyura, Pinnotheridae) and allies inferred from mitochondrial and nuclear molecular markers, with generic reassignment of twenty-one species. *Zoosystema*, 42(6), 85-103. <https://doi.org/10.5252/zoosystema2020v42a6>
- Tsang, L. M., Schubart, C. D., Ah Yong, S. T., Lai, J. C. Y., Au, E. Y. C., Chan, T.-Y., Ng, P. K. L., & 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* (C. C. Tudge, Ed.; 1st Edition).
- Tudge, C. C., Scheltinga, D. M., Jamieson, B. G., Guinot, D., & Richer de Forges, B. (2014). Comparative ultrastructure of the spermatozoa of the Majoidea (Crustacea, Decapoda, Brachyura) with new data on six species in five genera. *Acta Zoologica*, 95(1), 1-20. <https://doi.org/10.1111/azo.12005>
- Van der Meij, S. E., & Schubart, C. D. (2014). Monophyly and phylogenetic origin of the gall crab family Cryptochiridae (Decapoda: Brachyura). *Invertebrate Systematics*, 28(5), 491-500. <https://doi.org/10.1071/IS13064>
- Vehof, J., van der Meij, S. E., Türkay, M., & Becker, C. (2016). Female reproductive morphology of coral-inhabiting gall crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Cryptochiridae). *Acta Zoologica*, 97(1), 117-126. <https://doi.org/10.1111/azo.12111>
- Zmarzly, D. L. (1992). Taxonomic review of pea crabs in the genus *Pinnixa* (Decapoda: Brachyura: Pinnotheridae) occurring on the California shelf, with descriptions of two new species. *Journal of Crustacean Biology*, 12, 677– 713. <https://doi.org/10.1163/193724092X00166>.

Capítulo III

Ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides de *Johngarthia lagostoma* (H. Milne Edwards, 1837): qual o padrão morfológico para os Gecarcinidae descritos?

Resumo

Neste trabalho descrevemos a ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides para *Johngarthia lagostoma* e reanalisamos e descrevemos novos aspectos morfológicos de *Cardisoma ganhum* comparados à de outros representantes de Gecarcinidae disponíveis na literatura em busca de caracteres específicos para a família. Fragmentos do sistema reprodutor masculino foram fixados e processados para microscopia eletrônica de transmissão. Gecarcinídeos compartilham a presença de uma vesícula acrossomal com quatro zonas acrossomais, com a zona externa mostrando lamelas concêntricas, além do anel xantídeo modificado. No ápice da vesícula acrossomal, observa-se opérculo perfurado, botão apical, anel opercular acessório trilaminar e a aba periopercular. A família apresenta câmara perforatorial obovóide. Os espermatozoides dos gecarcinídeos aqui estudados e *C. carnifex* (previamente descrito), diferem pela morfologia do anel opercular acessório, anel xantídeo modificado, bem como no contato entre as zonas acrossomais e na posição das lamelas concêntricas. *Johngarthia lagostoma* apresenta anel opercular acessório curvado apenas na metade mesial, anel xantídeo modificado delgado, com formato de meia-lua iniciando-se na região anterior do anel espessado, o qual está situado na base da câmara perforatorial. A zona acrossomal externa está em contato direto apenas com a zona acrossomal intermediária e as lamelas concêntricas ocorrem apenas em contato com a zona acrossomal periférica. Em *C. ganhum* e *C. carnifex*, o anel opercular acessório é totalmente curvado, sendo o anel xantídeo modificado espesso, iniciando-se próximo a base da câmara perforatorial, recobrando totalmente o anel espessado, tornando-se delgado em direção opercular. Adicionalmente, a zona acrossomal externa tem contato direto com a zona acrossomal interna e intermediária e as lamelas preenchem totalmente a zona acrossomal externa. Os gecarcinídeos estudados apresentam as três sinapormorfias observadas em Thoracotremata: ausência de zona acrossomal raiada, presença das lamelas concêntricas na zona acrossomal externa e opérculo perfurado com botão apical. Gecarcinidae tem como característica o anel xantídeo modificado, anel opercular acessório, aba periopercular, câmara perforatorial obovóide, presença de quatro zonas acrossomais e cápsula acrossomal terminando na região anterior do anel espessado. A morfologia do anel opercular acessório, anel xantídeo modificado, o contato entre as zonas acrossomais e o posicionamento das lamelas concêntricas são caracteres taxonômicos exclusivos para os espermatozoides de Gecarcinidae. Apesar dos estudos envolvendo a filogenia molecular mostrarem a maior proximidade entre os representantes de Plagusiidae e Sesarmidae, os espermatozoides dos

gecarcinídeos compartilham mais caracteres com as espécies de Grapsidae, indicando alta homoplasia espermática em Thoracotremata.

Palavras-chave: análise ultraestrutural, caranguejos, células germinativas.

Introdução

A família Gecarcinidae MacLeay, 1838, integrante da superfamília Grapsoidea MacLeay, 1838, na subseção Thoracotremata Guinot, 1977, agrupa espécies com aberturas genitais localizadas no sexto e oitavo esternito torácico em fêmeas e machos, respectivamente. No Brasil, existem duas espécies de gecarcinídeos: *Johngarthia lagostoma* (H. Milne Edwards, 1837), conhecida como caranguejo - amarelo, endêmica de ilhas oceânicas (nos Arquipélagos de Fernando de Noronha, Trindade, Martim Vaz e Atol das Rocas); e *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1828, popularmente conhecido como caranguejo-azul, guaiamú, goiamú ou guaiamum, presente desde a Mata Atlântica em áreas menos úmidas e altas, até áreas estuarinas, em planícies de marés hipersalinas ou *Apicuns* (Melo, 1996; Pinheiro et al., 2016, Santos et al., 2022). Ambas as espécies são semi-terrestres, vivem em ambientes úmidos, com preferência aos solos menos sedimentados para escavar tocas e construir suas galerias. Ambas as espécies são ameaçadas de extinção no Brasil, *Cardisoma guanhumi* é ameaçado de extinção no Brasil, classificada como espécie vulnerável, principalmente devido aos impactos antrópicos, que resulta na perda, degradação e fragmentação de seus habitats naturais, enquanto *J. lagostoma* é considerada em perigo, devido a ser uma espécie insular, sendo afetada pela alteração da qualidade de seu habitat e predação por espécies exóticas (Pinheiro et al., 2016; MMA, 2022).

A ultraestrutura dos espermatozoides tem sido útil para esclarecer relações filogenéticas entre diferentes grupos de Decapoda (Tudge, 2009; Camargo et al., 2016, 2017; Assugeni et al., 2017; Garcia Bento et al., 2018). Os caranguejos apresentam muitas características espermáticas pouco comuns para a maioria dos animais. As células germinativas são imóveis e aflageladas, formadas por vesícula acrossomal volumosa, com diferentes camadas ou zonas que podem ou não ser concêntricas. A região central da vesícula acrossomal dos espermatozoides é marcada por uma invaginação do citoplasma subacrossomal, formando a câmara perforatorial, posicionada em geral abaixo do opérculo eletrodenso (Jamieson, 1994). Esta câmara perforatorial tem morfologia variável e é importante na diferenciação espermáticas entre famílias e espécies (Assugeni et al., 2017; Garcia Bento et al., 2018; Camargo et al 2020). Em Brachyura, o núcleo com envoltório nuclear vezes descontínuo, é preenchido por cromatina, e apresenta forma de taça ao redor da vesícula acrossomal e, na maioria das vezes, alcança a margem opercular. O núcleo pode apresentar microtúbulos e expansões digitiformes, como a projeção mediana posterior exclusiva de Majoidea Samouelle, 1819, ou braços radiais, laterais ou

nucleares, que variam numericamente entre as espécies de caranguejos (Jamieson 1994, Jamieson & Tudge, 2000; Assugeni et al., 2017; Garcia Bento et al., 2018). Os estudos acerca a ultraestrutura dos espermatozoides em Gecarcinidae são limitados e atualmente restritos a *Cardisoma carnifex* (Herbst, 1796) e *C. guanhumi* (Benetti et al., 2013). Logo, uma análise mais aprofundada para a família é necessária, inclusive para analisar outros gêneros além de *Cardisoma*.

Em relação à posição filogenética, os estudos morfológicos realizados por Guinot (1977), sobre os esternos torácicos e aberturas genitais de várias espécies de Brachyura, bem como alguns estudos com a ultraestrutura dos espermatozoides, apontam à monofilia de Thoracotremata (Jamieson, 1991, 1994). Além disso, estudos moleculares têm demonstrado a monofilia da subseção, sendo grupo - irmão das famílias de caranguejos de água doce (Wolfe et al., 2022, não revisado por pares). Estes mesmos trabalhos moleculares indicam o não monofiletismo de suas superfamílias, indicando forte tendência à polifilia (Kitaura et al., 2002; Schubart et al., 2006; Bracken-Grissom et al., 2014; Tsang et al., 2022; Wolfe et al., 2022). De acordo com o estudo molecular publicado por Tsang et al. (2014), o mais extenso em número de espécies e famílias de caranguejos analisadas até o momento, Gecarcinidae apresenta uma relação próxima às famílias Plagusiidae Dana, 1851, Sesarmidae Dana, 1851 e Varunidae H. Milne Edwards, 1853, indicando compartilhar uma história evolutiva mais recente, quando comparados com outros grupos dentro de Thoracotremata.

Neste estudo, descrevemos a ultraestrutura dos espermatozoides de *J. lagostoma* e reanalisamos o espermatozoide de *C. guanhumi*, procurando identificar características ultraestruturais compartilhadas (ou não) entre estes gecarcinídeos, além de comparar os resultados com espécies descritas na literatura científica. Com isso, buscamos caracteres homólogos para a família e apomórficos para diferenciar espécies, os quais poderão ser importantes para futuras análises em Thoracotremata ou úteis para a descrição de outras espécies de Gecarcinidae.

Material e Métodos

Machos maduros de *Johngarthia lagostoma* foram coletados manualmente durante as expedições do Grupo de Pesquisa em Biologia de Crustáceos (CRUSTA – UNESP, IB/ CLP, São Vicente), realizadas de fevereiro à março de 2019 e de abril à junho de 2022, na Ilha da Trindade, no município de Vitória, Espírito Santo, Brasil. Os animais coletados (n=10) foram dissecados, sendo os sistemas reprodutores fixados em

marPHEM (PHEM 1.5X + glutaraldeído 2.5% + sacarose) em água destilada (Montanaro et al., 2016). As amostras foram mantidas em fixador até o retorno da expedição, e transporte para o Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML) da UNESP Campus de Jaboticabal. Por sua vez, exemplares de *Cardisoma guanhumi* (n=3) foram coletados na Praia da Barra Seca, Município de Ubatuba, Brasil, em novembro de 2020 e transportados vivos para o IML.

No laboratório, o sistema reprodutor de *J. lagostoma* foi cuidadosamente dividido em pequenas porções com cerca de 1mm³, e mantidos no fixador por mais 4 horas. Os espécimes de *C. guanhumi*, anestesiados por resfriamento e dissecados, tiveram o sistema reprodutor fixado na mesma solução utilizada para *J. lagostoma*. Após a fixação, os materiais foram submetidos a três banhos em tampão marPHEM (1.5X) pH 7, 4, com duração de 10 minutos cada e, posteriormente foram pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% tamponado, por duas horas. As amostras foram contrastadas “EnBloc” com acetato de uranila 1% (overnight, 4°C), desidratadas em acetona (50 a 95%), embebidas e incluídas em resina Epon - Araldite. Os cortes semifinos e ultrafinos foram obtidos no ultra micrótomo Leica UC7, com uso de navalha de diamante. As grades com cortes ultrafinos (50 - 60 nm) foram contrastadas em acetato de uranila 5% em água, por 45 minutos, e citrato de chumbo 0,5% em NaOH 0,1 N, por 10 minutos. As amostras foram analisadas no MET Jeol JEM - 1010 com 80KV de aceleração eletrônica. As imagens foram digitalmente captadas com uso de câmera Gatan, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV, UNESP, Campus de Jaboticabal.

Para a razão acrossomal (C/ L), que representa a medida entre o comprimento (C) e largura (L) do acrossoma em milímetros, foi considerado como comprimento uma linha reta na margem da vesícula acrossomal, na altura da base da câmara perforatorial até o botão apical e como largura, a extensão equatorial, ou seja, de uma margem a outra da vesícula acrossomal. A classificação das estruturas espermáticas seguiu as nomenclaturas básicas utilizadas em Jamieson (1994) e Jamieson & Tudge (2000), enquanto a classificação da morfologia da câmara perforatorial foi baseada em formas planas, utilizadas na taxonomia das espécies gregarinas (Clopton, 2004).

Resultados

Características gerais dos espermatozoides

Os espermatozoides de *Johngarthia lagostoma* e *Cardisoma guanhumi* apresentam a vesícula acrossomal quase esférica, sendo envolvida, quase que

completamente, pela região nuclear, que é formada por quatro zonas acrossomais concêntricas, denominadas: acrossomal interna, acrossomal intermediária, acrossomal externa e acrossomal periférica. Ambas as espécies têm como característica a presença do anel xantídeo modificado na vesícula acrossomal. A câmara perforatorial obovóide é uma invaginação do citoplasma subacrossomal, localizada ao centro da vesícula acrossomal, sendo preenchida por túbulos perforatoriais. Sobre o ápice da câmara perforatorial encontra-se a região subopercular, com suas margens mostrando presença do anel opercular acessório. O opérculo centralmente perfurado, tem botão apical sobre a abertura e em suas margens ocorre a aba periopercular contínua com a cápsula da vesícula acrossomal. A base da câmara perforatorial é envolvida pelo anel espessado eletrodenso.

Espermatozoides e espermatóforos de Johngarthia lagostoma

Os espermatóforos de *J. lagostoma* variam de arredondados à elípticos, contendo em seu interior, a presença de vários espermatozoides, constituindo espermatóforos do tipo coenospérmicos. A parede dos espermatóforos é eletrodensa, com poucas ondulações. Em seu interior, os espermatozoides estão imersos em uma matriz granular e menos eletrodensa que a parede do espermatóforo. Os espermatóforos estão imersos em fluido seminal, com grânulos pequenos e eletrodensos grânulos, formando a secreção do tipo I, e outros grandes grânulos menos eletrodensos, constituindo a secreção do tipo II (Fig. 1A).

Em corte longitudinal, o espermatozoide mostra amplo núcleo com cromatina de aspecto fibrilar, vários braços radiais, delgados, os quais são evidenciados por várias vesículas esféricas em corte transversal (Fig. 1B). Como padrão neste estudo, o polo nuclear será denominado de polo posterior ou basal, em contraposição ao polo anterior (apical), onde está situado o opérculo sobre a vesícula acrossomal. A vesícula acrossomal é mais larga do que longa, com razão CL de $0,9 \pm 0,05$. O opérculo é centralmente perfurado e eletrodenso, sendo que suas margens mais centrais acompanham a extensão da câmara perforatorial para o polo mais anterior, tornando-se saliente ao espermatozoide. As margens do opérculo acompanham a forma curva da aba (“rim”) periopercular, recobrando a metade nesta região (Fig. 1B e C). A aba periopercular é contínua com a cápsula, uma área eletrolúcida delgada, localizada entre as unidades de membrana do acrossoma, e se entende até a altura do anel espessado da vesícula acrossomal, junto da base da câmara perforatorial (Fig 1B-F). A aba periopercular é eletrolúcida, e em sua margem de contato com a região subopercular, ocorre o anel opercular acessório. Este

anel é curvado na sua metade mesial e tem aspecto trilaminar, com uma lâmina central menos eletrodensa, entre as outras duas lâminas mais eletrodensas (Fig. 1C e D). A região subopercular é homogênea e menos eletrodensa que o opérculo. Sobre a perfuração opercular, observa-se a presença do botão apical (Fig. 1C). No citoplasma periacrossomal observam-se os centríolos e de sua porção subacrossomal invagina-se a câmara perforatorial (Fig. 1B, E e F). A câmara perforatorial é muito profundamente obovóide de ápice amplo e arredondado (Fig. 1B e C). A base da câmara perforatorial é marcada por apresentar anel espessado granular no interior da vesícula acrossomal, o qual é menos eletrodense, e contínuo anteriormente ao anel espessado, onde inicia-se o anel xantídeo modificado (Fig. 1E-F). Em *J. lagostoma* o anel xantídeo modificado é bastante delgado, homogêneo, curvo, com formato de meia-lua, tornando-se mais delgado apicalmente, porém não alcança a região subacrossomal (Fig. 1C, E e F). A vesícula acrossomal apresenta quatro zonas concêntricas, sendo as zonas interna e intermediária separadas quase que totalmente das zonas externa e periférica, devido ao posicionamento do anel xantídeo modificado. Assim, no terço apical da vesícula acrossomal, a zona intermediária está em contato com a zona externa, após o término ou ápice do anel xantídeo modificado. A zona mais interna é mais eletrodensa que a intermediária, e ambas acompanham a forma de meia-lua do anel xantídeo modificado (Fig. 1F). A zona acrossomal externa ocupa grande parte do volume da vesícula acrossomal e contém lamelas periféricas concêntricas próximas a zona periférica, sendo esta última mais delgada e menos eletrodensa. Em corte transversal, próximo da altura média ou equatorial da câmara perforatorial, nota-se a presença de todas as zonas acrossomais, além da presença do delgado anel xantídeo modificado (Fig. 1G). No corte transversal na altura da base da câmara perforatorial, observa-se o anel espessado em contato com a capsula acrossomal e somente as zonas acrossomal externa, com as lamelas concêntricas, e a periférica. Nesta secção é possível observar ainda os delgados braços radiais em corte oblíquo (Fig. 1H).

Espermatozoides e espermatóforos de Cardisoma guanhumi

Os espermatóforos encontram-se imersos no fluido seminal, que é composto por matriz homogênea, menos eletrodensa que os grânulos mais achatados da secreção do tipo I e mais eletrodensa que os grandes grânulos da secreção do tipo II. Os espermatóforos são volumosos, variando de arredondados à elípticos, com parede eletrodensa delgada, contendo muitos espermatozoides imersos em matriz discretamente granular um pouco menos eletrodensa que a parede (Fig. 2A). Os espermatozoides de *C.*

guanhumi exibem amplo núcleo no polo posterior, com cromatina muito fibrilar e vários braços radiais delgados em corte transversal (Fig. 2B). A vesícula acrossomal é mais larga do que longa, com razão CL de $0,9 \pm 0,05$. No polo apical, o opérculo é centralmente saliente, perfurado, eletrodenso e com a presença de botão apical. As margens laterais do opérculo recobrem até a metade apical da aba periopercular, a qual é contínua com cápsula sendo ambas eletrolúcidas (Fig. 2B e C). A cápsula acrossomal estende-se da aba periopercular até o final do anel espessado no interior da vesícula acrossomal e o início da zona acrossomal interna (Fig. 2D e C-E). A região subopercular tem material eletrodenso, homogêneo e particularmente distribuído sob a área saliente e central do opérculo. Esta região termina lateralmente na margem da aba periopercular e no anel opercular acessório, o qual é trilaminar, curto e totalmente curvado (Fig. 2C). A câmara perforatorial tem morfologia estreitamente obovóide, com ápice amplo e arredondado, moldando a saliência opercular (Fig. 2B e C). A base da câmara perforatorial apresenta anel espessado granular na margem interna da vesícula acrossomal, o qual está em contato com o anel xantídeo modificado. Este anel modificado ocorre desde o a porção basal do anel espessado, (recobrando-o totalmente até o terço apical da câmara perforatorial (Fig. 2D). O anel xantídeo modificado é a camada mais eletrodensa da vesícula acrossomal, sendo bastante espesso no polo basal e tornando-se progressivamente mais delgado anteriormente, sem separar por completo as zonas acrossomais (Fig. 2B, C e E). A vesícula acrossomal contém quatro zonas concêntricas, onde a interna e intermediária estão separadas quase que totalmente da externa e periférica. Tanto a zona interna como a intermediária têm contato com a zona externa no terço apical da vesícula acrossomal, devido ao ápice do anel xantídeo modificado. A zona interna é mais eletrodensa, enquanto a delgada zona intermediária e a grande zona externa tem a mesma eletrodensidade. Contudo, a zona externa está totalmente preenchida por lamelas concêntricas. A zona periférica é a menos eletrodensa, tendo aspecto trilaminar devido a presença de uma lamela central eletrodensa (Fig. 2E). Nos cortes transversais, em diferentes alturas da vesícula acrossomal, desde o polo apical (Fig. 2F e G) até o basal (Fig. 2H), é possível observar as variações na distribuição das zonas concêntricas em relação ao anel xantídeo modificado e espesso. Nota-se ainda a cápsula próxima ao anel espessado junto a base da câmara perforatorial (Fig. 2H).

Figuras, tabela e legendas

Figura 1

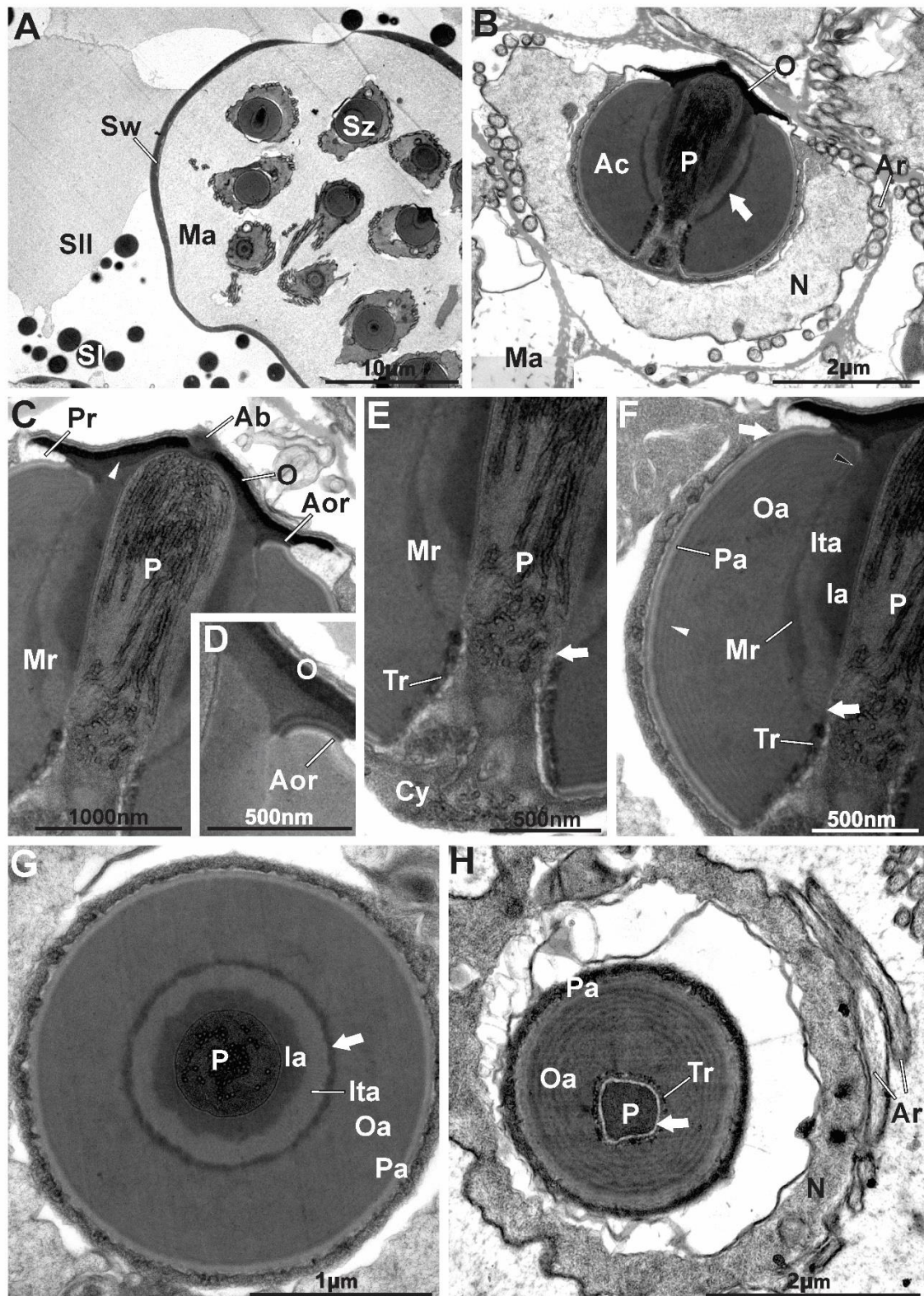


Figura 1. Ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides de *Johngarthia lagostoma*. **A.** Aspecto geral dos espermatóforos coenospérmicos de *J. lagostoma*, na região média do vaso deferente, imersos em fluido seminal, constituído por uma matriz, com grânulos que formam as secreções dos tipos I e II. **B.** Seção longitudinal do espermatozoide, mostrando a vesícula acrossomal com o anel xantídeo modificado delgado (seta), a câmara perforatorial e o núcleo que envolve quase toda a vesícula acrossomal. **C.** Detalhe do ápice da câmara perforatorial obovóide e do opérculo eletrodenso perfurado, com botão apical. Note a aba periopercular, o anel opercular acessório e a região subopercular (cabeça de seta). **D.** Detalhe do anel opercular acessório trilaminar, curvado em sua metade mesial. **E.** Anel espessado eletrodenso e granular, envolvendo a base da câmara perforatorial e contínuo com o anel xantídeo modificado, o qual tem aspecto delgado, homogêneo e com formato de meia-lua. Note o fim da cápsula acrossomal (seta), próximo ao anel espessado. **F.** Detalhe das zonas acrossomais, mostrando a zona interna, fazendo limite com a câmara perforatorial. A zona intermediária está em contato com o anel xantídeo modificado e com a zona acrossomal externa (cabeça de seta preta). A zona acrossomal externa possui discretas lamelas próximas à zona periférica (cabeça de seta branca) e a cápsula ocorre desde as margens do opérculo até o início posterior da zona acrossomal interna (setas brancas). **G.** Corte transversal na altura média da câmara perforatorial, mostrando as zonas acrossomais interna, intermediária, externa e periférica e o anel xantídeo modificado (seta). **H.** Corte transversal na altura do anel espessado envolvendo a base da câmara perforatorial. Note as lamelas concêntricas da zona acrossomal externa e a cápsula acrossomal (seta). Ab= botão apical; Ac= vesícula acrossomal; Aor= anel opercular acessório; Ar= braços radiais; Cy= centríolo; Ia= zona acrossomal interna; Ita= zona acrossomal intermediária; Ma= matriz extracelular; Mr= anel xantídeo modificado; N= núcleo; P= câmara perforatorial; Pr= aba periopercular; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; Pa= zona acrossomal periférica; Sw= parede do espermatóforo; Sz= espermatozoide; SI= secreção do tipo I; SII= secreção do tipo II; Tr= anel espessado.

Figura 2

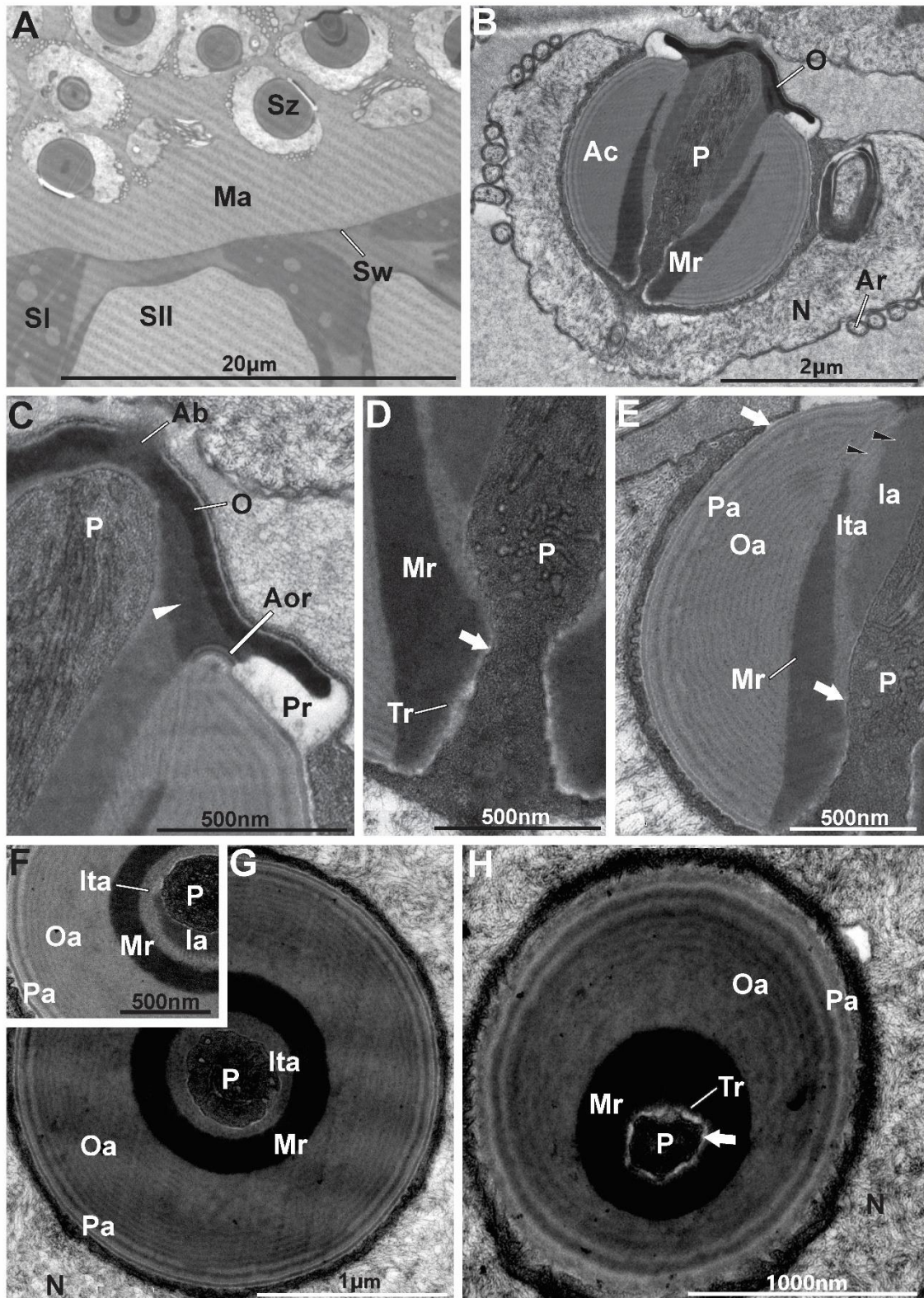


Figura 2. Ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides de *Cardisoma guanhumi*. **A.** Espermatóforos grandes e coenospérmicos de *C. guanhumi*, com parede delgada e imersos em matriz eletrolúcida, com secreção tipo I mais eletrodensa do que a tipo II. **B.** Corte longitudinal da vesícula acrossomal, preenchida centralmente pela câmara perforatorial obovóide. Note o núcleo envolvendo quase toda a vesícula acrossomal, mostrando os braços radiais. O anel xantídeo modificado característico de Gecarcinidae, é espesso e eletrodense. **C.** Detalhe do ápice da vesícula acrossomal com opérculo perfurado, recoberto por botão apical. Na periferia do opérculo está a aba periopercular. O anel opercular acessório é curvo e tem contato com a região subopercular (cabeça de seta). **D.** Base da câmara perforatorial mostrando o anel espessado granular envolvendo a cápsula do acrossoma (seta), e em contato com o anel xantídeo modificado, que é eletrodense e bastante espesso. **E.** Zonas acrossomais interna e intermediária, separadas da zona acrossomal externa e da acrossomal periférica pelo anel xantídeo modificado. Note na região mais anterior do acrossoma, a zona acrossomal externa em contato com as zonas intermediária e interna (cabeças de seta preta) e a presença da cápsula acrossomal (setas) **F.** Corte transversal próximo ao ápice da câmara perforatorial, exibindo as zonas acrossomais e o anel xantídeo modificado. **G.** Corte transversal mostrando a ausência de zona acrossomal interna. **H.** Em corte transversal na base da câmara perforatorial exibindo a cápsula acrossomal (seta) e o anel espessado granular em contato com o anel xantídeo modificado. Ab= botão apical; Ac= vesícula acrossomal; Aor= anel opercular acessório; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; Ita= zona acrossomal intermediária; Ma= matriz extracelular; Mr= anel xantídeo modificado; N= núcleo; P= câmara perforatorial; Pr= aba periopercular; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; Pa= zona acrossomal periférica; Sw= parede do espermatóforo; Sz= espermatozoide; SI= secreção do tipo I; SII= secreção do tipo II; Tr= anel espessado.

Tabela 1. Comparação ultraestrutural dos espermatozoides dos Gecarcinidae do presente estudo e outros representantes de Thoracotremata da literatura.

Família	Gecarcinidae			Varunidae			Sesarmidae		Grapsidae
Características espermáticas	<i>Johngarthia lagostoma</i> ¹	<i>Cardisoma guanhumi</i> ^{1,2}	<i>Cardisoma carnifex</i> ³	<i>Cyclograpsus punctatus</i> ⁴	<i>Varuna literata</i> ³	<i>Eriocheir japonica</i> ⁵	<i>Parasesarma erythodactylum</i> ⁶	<i>Parasesarma catenata</i> ⁴	<i>Geograpsus lividus</i> ⁷
1. Razão acrossomal	0.9±0.05	0.9±0.05	0.9	1.03	0.907	N	N	N	1.0 ± 0.07
2. Zonação acrossomal	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a
3. Opérculo	Perfurado ^a	Perfurado ^a	Perfurado ^a	Perfurado ^a	Perfurado ^a	Perfurado ^a	Perfurado ^a	Perfurado ^a	Perfurado ^a
4. Espessura opercular	Moderado ^a	Moderado ^a	Moderado ^a	Moderado ^a	Moderado ^a	Moderado ^a	Moderado ^a	Moderado ^a	Moderado ^{a*}
5. Projeções operculares	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a
6. Continuidade do opérculo com a cápsula acrossomal	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a
7. Protuberância de material subopercular no opérculo	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a
8. Botão apical	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Ausente ^b	Ausente ^b	Ausente ^b	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a
9. Aba periopercular	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Ausente ^b	Presente ^a	Ausente ^b	Presente (pouco desenvolvido) ^a	Presente ^a	Presente ^a
10. Anel opercular acessório	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	N	Presente ^a	Ausente ^{b?}	Presente ^a	N	Presente ^a
11. Número de camadas acrossomais	4 ^a	4 ^a	3 ^b	3 ^b	3 ^b	3 ^b	3 ^b	3 ^b	4 ^b
12. Zona acrossomal interna	Estreita/curvada ^a	Estreita/curvada ^a	Ampla/reta ^b	Ampla/ arredondada ^c	Estreita/reta ^d	Ampla/arredondada ^c	Estreita/reta ^d	Estreita/reta ^d	Estreita/curvada ^{b?}
13. Zona acrossomal raiada	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a
14. Zona acrossomal externa	Ampla ^a	Ampla ^a	Ampla ^a	Ampla ^a	Ampla ^a	Ampla ^a	Ampla ^a	Ampla ^a	Ampla ^a
15. Lamelas concêntricas na zona acrossomal externa	Ausente ^a	Presente ^{b*}	Presente ^b	Presente ^b	Presente ^b	Presente ^b	Presente ^b	N	Presente/ pouco evidente ^b
16. Zona acrossomal intermediária	Presente ^a	Presente ^a	Ausente ^b	Ausente ^b	Ausente ^b	Ausente ^b	Ausente ^b	Ausente ^b	Presente ^b
17. Zona acrossomal periférica	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a
18. Anel Xanthidae modificado	Vestigial ^{a*}	Presente ^{b*}	Presente ^b	Ausente ^c	Ausente ^c	Ausente ^c	Ausente ^c	Ausente ^c	Presente ^{a?}
19. Morfologia da câmara perforatorial	Obovóide ^{a*}	Obovóide ^{b*}	Obovóide ^{b?}	Deltóide ^{c?}	Ovóide ^{d?}	N	Deltóide ^{c?}	Deltóide ^{c?}	Deltóide ^{b?}
20. Ápice da câmara perforatorial	Amplamente arredondado ^a	Amplamente arredondado ^a	Amplamente arredondado ^a	Estreito/ arredondado ^b	Amplamente arredondado ^a	Amplamente arredondado ^a	Amplamente arredondado ^a	Estreito/ arredondado ^b	Estreito/Cônico ^{b?}
21. Anel espessado	Presente ^a	Presente ^a	Ausente ^b	Ausente ^b	Presente ^a	N	Ausente ^b	N	Ausente ^{a?}
22. Corrugações da parede da câmara perforatorial	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a
23. Braços radiais	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a
24. Centríolos	Presente ^a	Ausente ^b	Ausente ^b	Ausente ^b	Ausente ^b	Ausente ^b	Ausente ^b	Ausente ^b	Ausente ^b
25. Cromatina	Fibrilar ^a	Fibrilar ^a	Fibrilar ^a	Granular ^b	Granular ^b	Granular ^b	Granular ^b	Granular ^b	Fibrilar ^{a*}
26. Núcleo	Pequeno ^a	Pequeno ^a	Pequeno ^a	Pequeno ^a	Pequeno ^a	N	Pequeno ^a	N	Pequeno ^{a?}

Continuação na próxima página

Família	Grapsidae				Ocypodidae				
Características espermáticas	<i>Pachygrapsus gracilis</i> ⁷	<i>Pachygrapsus transversus</i> ⁷	<i>Grapsus albolineatus</i> ⁶	<i>Metopograpsus messor</i> ⁸	<i>Ocypode quadrata</i> ⁹	<i>Minuca vocator</i> ¹⁰	<i>Leptuca thayeri</i> ¹⁰	<i>Uca maracoani</i> ¹⁰	<i>Ucides cordatus</i> ¹¹
1. Razão acrossomal	1.1 ± 0. 1	1.2 ± 0.1	N	N	1.0 ± 0.08	0.77	0.84	0.77	1.1 ± 0.05
2. Zonação acrossomal	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a	Concêntrica ^a
3. Opérculo	Perfurado ^a	Perfurado ^a	Perfurado ^a	Contínuo ^a	Perfurado ^a	Perfurado ^a	Contínuo ^a	Perfurado ^a	Contínuo ^a
4. Espessura opercular	Moderado ^a	Moderado ^a	Moderado ^a	Delgado ^{c?}	Delgado ^{b?}	Moderado ^a	Moderado ^a	Moderado ^a	Delgado ^b
5. Projeções operculares	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a
6. Continuidade do opérculo com a cápsula acrossomal	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a	Descontínuo ^a
7. Protuberância de material subopercular no opérculo	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a
8. Botão apical	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Ausente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Ausente ^a	Presente ^a	Ausente ^b
9. Aba periopercular	Presente ^a	Presente ^a	Ausente ^b	Presente ^b	Presente ^a	Ausente ^{b?}	Ausente ^{b?}	Ausente ^{b?}	Presente ^a
10. Anel opercular acessório	Presente ^a	Presente ^a	N	Presente ^b	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Ausente ^b
11. Quantidade de camadas acrossomais	4 ^a	4 ^a	4 ^a	3 ^a	4 ^a	3 ^b	3 ^b	3 ^b	4 ^a
12. Zona acrossomal interna	Ampla/reta ^b	Estreita/reta ^d	Estreita/reta ^d	Estreita/reta ^c	Ampla/curvada ^e	Estreita/curvada ^{e?}	Ampla/ curvada ^{e?}	Ampla/ curvada ^{e?}	Ampla/curvada ^{e?}
13. Zona acrossomal raiada	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Presente (vestigial) ^b
14. Zona acrossomal externa	Ampla ^a	Ampla ^a	Ampla ^a	Ampla ^a	Moderada ^b	Ampla ^a	Ampla ^a	Ampla ^a	Moderada ^b
15. Lamelas concêntricas na zona acrossomal externa	Presente/ Pouco evidente ^c	Presente/ pouco evidente ^c	N	Presente ^b	Presente/pouco evidente ^c	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Presente/ pouco evidente ^c
16. Zona acrossomal intermediária	Presente ^b	Presente ^b	Presente ^b	Ausente ^a	Presente ^b	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Presente ^b
17. Zona acrossomal periférica	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Ausente ^b	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a
18. Anel Xanthidae modificado	Ausente ^b	Ausente ^b	Ausente ^b	N	Presente ^b	Ausente ^c	Ausente ^c	Ausente ^c	Ausente ^c
19. Morfologia da câmara perforatorial	Piriforme ^{e?}	Piriforme ^{e?}	Panduriforme ^{f?}	N	Oblongo ^{g?}	Obovoide ^{a?}	Obovoide ^{b?}	Obovoíde ^{a?}	Ovoíde ^{h?}
20. Ápice da câmara perforatorial	Ampla/ arredondado ^a	Ampla / arredondado ^a	Estreito/ arredondado ^{b?}	Ampla/cônico ^{e?}	Ampla / arredondado ^a	Ampla /arredondado ^a	Ampla /arredondado ^a	Ampla /arredondado ^a	Estreit o/ arredondado ^{b?}
21. Anel espessado	Ausente ^b	Ausente ^b	Ausente ^b	Ausente ^b	N	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a
22. Corrugações da parede da câmara perforatorial	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^{a?}	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a
23. Braços radiais	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a	Presente ^a
24. Centríolos	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^{a?}	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a	Ausente ^a
25. Cromatina	Granular ^b	Granular ^b	Granular ^b	Reticulado ^c	Fibrilar ^{a?}	Fibrilar ^a	Fibrilar ^a	Fibrilar ^a	Granular ^{b?}
26. Núcleo	Pequeno ^a	Pequeno ^a	Pequeno ^{a?}	Volumoso ^a	Pequeno ^a	Volumoso ^{b?}	Volumoso ^{b?}	Volumoso ^{b?}	Pequeno ^{a?}

¹Presente estudo; ²Benetti et al. (2013); ³Jamieson et al. (1996); ⁴ Jamieson & Tudge (2000); ⁵Yasuzumi (1960); ⁶Jamieson (1991); ⁷Tiseo et al. (2017); ⁸Anilkumar et al. (1999); ⁹Matos et al. (2001);

¹⁰Benetti et al. (2008); ¹¹Matos et al. (2000).

Letras diferentes indicam variação entre as espécies, * =diferença entre as espécies do presente estudo; N= não descrito; ?= não descrito e observado nas figuras publicadas; linha destacada em amarelo= principal diferença entre as espécies.

Discussão

Em Thoracotremata, a ultraestrutura dos espermatóforos foi descrita para algumas espécies em Gecarcinidae, Sesarmidae, Grapsidae MacLeay, 1838 e Ocypodidae Rafinesque, 1815 (El-Sherief, 1991; Subramoniam, 1993; Jamieson, 1994; Anilkumar et al., 1999; Matos et al., 2000; Matos et al., 2001; Cuartas & Sousa, 2007; Benetti et al., 2008, 2013; Tiseo et al., 2017; Kumarasamy et al., 2022). O padrão entre estas famílias e, principalmente em todos os Gecarcinidae, é a presença de espermatóforos coenospérmicos. Contudo, a única exceção observada em Thoracotremata foi observada *P. gracilis* (Tiseo et al. 2014, 2017). Nesta espécie de Grapsidae, os espermatóforos são do tipo cleistospérmicos (um espermatozoide por espermatóforo) e foi proposta que esta característica parece facilitar uma rápida deiscência, visto que as fêmeas, ao realizar a muda da puberdade, já se encontram com o ovário desenvolvido (Hartnoll, 1965; Tiseo et al., 2014, 2017). Tal evento ovariano parece não ocorrer em Gecarcinidae (Bento Garcia, Pinheiro e Zara).

Os espermatóforos dos gecarcínídeos estudados apresentam parede eletrodensa e estão imersos em fluido seminal composto por grânulos de diferentes tamanhos e eletrodensidades, sendo que em *J. lagostoma* tais grânulos exibem morfologia esférica e em *C. guanhumi* um dos tipos de secreção possui aspecto achatado ou lenticular como descrito por Benetti et al. (2013). A parede dos espermatóforos, em conjunto com o fluido seminal, fornece proteção aos espermatozoides, principalmente durante a transferência espermática, podendo estar envolvidos em diferentes estratégias de deiscência e fertilização nos animais (Subramoniam, 1993). Ao compararmos a parede dos espermatóforos nas duas espécies estudadas percebe-se que apesar de possuir apenas uma camada, essa é mais espessa em *Johngarthia*. Entre os Thoracotremata, é possível observar uma variação morfológica, diferente do padrão de espermatóforo formado por uma parede eletrodensa observado em *J. lagostoma* e *C. guanhumi*. No sesarmídeo *Muradium tetragonum* (Fabricius, 1798), esta estrutura é formada por duas camadas com diferentes eletrodensidades, enquanto entre Grapsidae e Ocypodidae observa-se grande variação no número de camadas da parede do espermatóforo (Cuartas e Sousa 2007; Lautenschlager et al., 2010; Tiseo et al., 2017; Kuramarasamy et al., 2022). A parede dos espermatóforos exibe três camadas em *Metopograpsus messor* (Forskal, 1775) e *Geograpsus lividus* (H. Milne Edwards, 1837), quatro em *Pachygrapsus transversus* (Gibbes, 1850) e sete em *Pachygrapsus gracilis* (de Saussure, 1957), sendo elas com

distintas eletrodensidades e espessuras (Anilkumar et al., 1999; Tiseo et al., 2017). No Ocypodidae *Leptuca uruguayensis* (Nobili, 1901) ainda como *Uca uruguayensis* em Cuartas & Sousa (2007), os espermatóforos possuem parede formadas por duas camadas, enquanto em *Afruca tangeri* (Eydoux, 1835) como *Uca tangeri* em Lautenschlager et al. (2010), a parede pode apresentar duas a três camadas filamentosas. Segundo Subramoniam (1993), os espermatóforos poderiam ter surgido entre os crustáceos marinhos em resposta ao estilo de vida e adaptação reprodutiva desses animais aos seus respectivos ambientes. Desta forma, é possível que a variação da morfologia dos espermatóforos e fluido seminal esteja relacionada às diferentes estratégias reprodutivas e adaptações ambientais adotadas pelos gecarcinídeos do presente estudo e demais caranguejos Thoracotremata.

Os espermatozoides dos Gecarcinidae do presente estudo e *C. carnifex* descrito (Jamieson et al., 1996), seguiram o padrão observado para os Thoracotremata, compartilhando as três principais sinapomorfias propostas por Jamieson e Tudge (2000): perda da zona acrossomal raiada, presença do botão apical e lamelas concêntricas da vesícula acrossomal. A ultraestrutura dos espermatozoides de *C. guanhumi* do presente estudo é idêntica ao padrão descrito por Benetti et al. (2013). Porém, algumas novas características foram descritas ou aprofundadas neste estudo com a comparação entre *C. carnifex* e *J. lagostoma*. Os espermatozoides de *J. lagostoma* e *C. guanhumi* comparado ao de *C. carnifex* em Jamieson et al (1996), compartilham a câmara perforatorial obovóide, a presença de um opérculo perfurado, botão apical, anel opercular acessório, aba periopercular e a presença de lamelas concêntricas na zona acrossomal externa (tabela 1). Desta maneira, estas características podem ser consideradas como características chaves para a família, levando em consideração o atual conhecimento disponível. No entanto, estes três gecarcinídeos diferem especificamente em relação à morfologia do anel opercular acessório e anel xantídeo modificado, além de exibirem diferentes padrões de contato entre as zonas acrossomais e posicionamento das lamelas concêntricas. *Cardisoma guanhumi* e *C. carnifex*, exibem anel opercular acessório de aspecto trilaminar, não descrito anteriormente, como observado para *J. lagostoma*. Entretanto, em *C. guanhumi* esta estrutura é curvada apenas na metade mesial, enquanto a morfologia desta estrutura é totalmente curvada em *J. lagostoma* (presente estudo) e *C. carnifex*, (Jamieson et al., 1996). Para *Cardisoma*, o anel xantídeo modificado ocorre desde à base da câmara perforatorial, recobre completamente o anel espessado, sendo mais espesso nesta região e se estende em direção ao ápice da vesícula acrossomal, onde se torna mais

delgado, parecendo ser a característica do gênero, como também observado nas imagens. Por sua vez, em *J. lagostoma*, o anel xantídeo modificado é contínuo ao anel espessado, não o recobrando, é delgado e curvo, assumindo a forma de meia-lua ou da cetra “C”. Como característica nova aqui observada, a zona acrossomal interna em *C. guanhumi* e *C. carnifex* tem contato direto com a externa, sendo esta última zona totalmente preenchida pelas lamelas concêntricas. Enquanto em *J. lagostoma*, apenas a zona acrossomal intermediária está em contato com a zona acrossomal externa e as lamelas concêntricas se concentram, principalmente, na região de contato com a zona acrossomal periférica.

O anel espessado, que circunda a base da câmara perforatorial, posicionado na margem interna da membrana da vesícula acrossomal, está presente em *J. lagostoma*, está presente também em *C. guanhumi* e, muito provavelmente também ocorre em *C. carnifex*, apesar de ter sido descrito como ausente em *Cardisoma* (Jamieson et al., 1996; Benetti et al., 2013). Em *C. guanhumi*, e muito provavelmente em *C. carnifex*, observa-se que a eletrodensidade do anel xantídeo modificado é bastante semelhante à do anel espessado e só com ampliação significativa da região, este pode ser notado. Assim, a ausência desta estrutura pode ter sido um engano na descrição de *Cardisoma* spp. Com os dados de *J. lagostoma*, fica claro a presença no anel espessado e sua ligeira diferença de eletrodensidade com o anel xantídeo modificado, que ocorre em justaposição a ele.

A comparação dos espermatozoides dos caranguejos gecarcinídeos deste estudo com outros caranguejos Grapsoidea descritos na literatura, revela que o grupo apresenta maior similaridade de caracteres de seus espermatozoides com os representantes de Grapsidae (Tabela 1). As diferenças observadas estão relacionadas à morfologia da zona acrossomal interna, câmara e ápice perforatorial, bem como pela presença do anel xantídeo modificado e do anel espessado. Em *J. lagostoma*, *C. guanhumi* e *G. lividus*, a zona acrossomal interna mostra morfologia estreita e curvada; para *P. gracilis* ela é do tipo ampla e reta; enquanto que em *P. transversus*, *Gr. albolineatus* e *M. messor* a zona acrossomal interna é do tipo estreita e reta (Jamieson, 1991; Tiseo et al., 2017). Por sua vez, os gecarcinídeos do presente estudo possuem câmara perforatorial obovóide, diferindo do formato estreitamente piriforme de *P. transversus* e *P. gracilis*, do tipo estreitamente panduriforme em *Gr. albolineatus* e do tipo profundamente deltóide em *G. lividus*. O ápice da câmara perforatorial em *J. lagostoma* e *C. guanhumi* estende-se além da região anterior da vesícula acrossomal, fazendo com que o botão apical e a região central do opérculo se posicionem além dos limites laterais da vesícula acrossomal, algo

que não é observado nos grapsídeos. Adicionalmente, o ápice da câmara perforatorial mostra-se amplo e arredondado, semelhante ao padrão observado em *P. gracilis* e *P. transversus*, porém diferente do ápice estreito e cônico descrito para *G. lividus*; estreito e arredondado em *Gr. albolineatus* e amplo e cônico observado em *M. messor* (Jamieson, 1991; Anilkumar et al., 1999; Tiseo et al., 2017). Os gecarcinídeos aqui estudados apresentam um anel xantídeo modificado, enquanto que esta estrutura foi descrita como ausente em *P. gracilis*, *P. transversus* e *G. lividus*. No entanto, existe a possibilidade de sua presença em outros representantes desta família, como descrito por Jamieson (1994). De acordo com a análise cladística dos caracteres espermáticos ultraestruturais realizada pelo último autor, o anel xantídeo modificado observado nos representantes de Thoracotremata é considerado um caráter homoplásico. Adicionalmente, o anel espessado observado em *J. lagostoma* e *C. guanhumi* é descrito como ausente ou reduzido para os representantes de Grapsidae (Jamieson, 1991, 1994; Tiseo et al., 2017).

Quando comparamos os espermatozoides de *J. lagostoma* e *C. guanhumi*, com representantes de Ocypodidae, como *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787), *Uca maracoani* (Latreille, 1803), *Leptuca thayeri* (Rathbun, 1900) e *Minuca vocator* (Herbst, 1804), foi observada uma maior variação na ocorrência dos caracteres espermáticos (Matos et al., 2000, 2001; Benetti et al., 2008, 2013). O opérculo perfurado eletrodenso e a presença do anel espessado mostram ser características compartilhadas. Em contrapartida, o anel opercular acessório parece ser formado por apenas uma lamela eletrodensa, enquanto nos gecarcinídeos observa-se a estrutura trilaminar (Matos et al., 2000; Matos et al., 2001; Benetti et al., 2013). O botão apical está descrito como ausente apenas para *L. thayeri* e também não foi observado em *U. cordatus* e as lamelas concêntricas da zona acrossomal externa estão presentes apenas em *J. lagostoma* e *C. guanhumi* (Matos et al., 2000, 2001; Benetti et al., 2013). A aba periopercular observada em *J. lagostoma* e *C. guanhumi* é descrito como ausente nas espécies *U. maracoani*, *L. thayeri* e *Min. vocator*, sendo que para *Ucides* e *Ocypode*, este caráter não foi descrito e sua ocorrência é difícil de ser confirmada pelas micrografias da literatura (Matos et al., 2000; Matos et al., 2001; Benetti et al., 2013). O anel xantídeo modificado, observado em *J. lagostoma* e *C. guanhumi*, está ausente nos caranguejos chama-marés e apesar de não serem descritos, parecem ocorrer em *Ucides* e *Ocypode* (Matos et al., 2000, 2001). O anel xantídeo modificado é delgado em *J. lagostoma*, sendo que em *Ucides* e *Ocypode* essa estrutura parece ser mais semelhante a este padrão, do que

à morfologia mais espessa, como observada nos gêneros de *Cardisoma* (Matos et al., 2000, 2001; Benetti et al., 2008, 2013).

De acordo com a filogenia molecular de Tsang et al. (2014), a família Gecarcinidae está mais relacionada às famílias Plagusiidae e Sesarmidae, sugerindo que essas famílias possam ter compartilhado um ancestral comum com características semelhantes. No entanto, não existem trabalhos que descrevam a ultraestrutura dos espermatozoides para Plagusiidae e são poucos os estudos com representantes de Sesarmidae, o que dificulta a identificação de caracteres espermáticos compartilhados ou divergentes entre essas famílias. Entre os caracteres espermáticos conhecidos, apenas a presença do botão apical parece ser uma característica ancestral consistente que une tais famílias. Como esse caráter é compartilhado com outros representantes de Thoracotremata, é provável que o botão apical seja uma das sinapomorfias da subseção, como anteriormente proposto por Jamieson (1994) e Jamieson et al. (1995). No entanto, é importante ressaltar que estudos futuros sobre a ultraestrutura dos espermatozoides de Plagusiidae e Sesarmidae, bem como com outros Thoracotremata podem fornecer informações valiosas sobre a evolução dessas famílias e suas relações filogenéticas com outras famílias de caranguejos.

Em conclusão, os espermatozoides de *J. lagostoma* e *C. guanhumi* apresentam características ultraestruturais que indicam a presença das três sinapomorfias descritas para Thoracotremata, incluindo a perda da zona acrossomal raiada, a presença do botão apical e lamelas concêntricas da vesícula acrossomal. Os espermatozoides da família Gecarcinidae apresentam uma câmara perforatorial obovóide com opérculo perfurado, botão apical, anel opercular acessório, aba periopercular e lamelas concêntricas na zona acrossomal externa e anel xantídeo modificado. No entanto, existem diferenças notáveis na morfologia do anel opercular acessório e do anel xantídeo modificado que representa um caráter homoplásico entre os caranguejos, bem como no contato entre as zonas acrossomais e posição das lamelas concêntricas. A comparação dos espermatozoides de Gecarcinidae com os de outras famílias de Thoracotremata, sugere uma maior semelhança de características ultraestruturais com os representantes de Grapsidae do que com os de Ocypodidae.

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(2), 361-370.
- Assugeni, C. D. O., Magalhaes, T., Bolanos, 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(12), 1628-1646. <https://doi.org/10.1002/jmor.20737>
- 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>
- Benetti, A. S., Tavares, M., Carvalho dos Santos, D., & Tudge, C. (2013). Ultrastructure of the spermatophores and spermatozoa from the gecarcinid land crab, *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1828, (Crustacea, Brachyura, Gecarcinidae) from the western Atlantic. *Invertebrate Reproduction & Development*, 57(1), 61-69. <https://doi.org/10.1080/07924259.2012.666506>
- Bracken-Grissom, H. D., Ah Yong, S. T., Wilkinson, R. D., Feldmann, R. M., Schweitzer, C. E., Breinholt, J. W., ... & Crandall, K. A. (2014). The emergence of lobsters: phylogenetic relationships, morphological evolution and divergence time comparisons of an ancient group (Decapoda: Achelata, Astacidea, Glypheidea, Polychelida). *Systematic Biology*, 63(4), 457-479. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syu008>
- 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>

- Camargo, T. R., Wolf, M. R., Mantelatto, F. L., Tudge, C., & Zara, F. J. (2020). Ultrastructure of spermatozoa of members of Calappidae, Aethridae and Menippidae and discussion of their phylogenetic placement. *Acta Zoologica*, 101(1), 89-100. <https://doi.org/10.1111/azo.12273>
- Clopton, R. E. (2004). Standard nomenclature and metrics of plane shapes for use in gregarine taxonomy. *Comparative Parasitology*, 71(2), 130-140. <https://doi.org/10.1654/4151>
- Cuartas, E. I., & Sousa, L. G. (2007). Ultrastructural study of the spermatophores and spermatozoa in *Uca uruguayensis* (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). *Biociências*, 15(1), 21-28.
- 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., 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>
- Guinot, D. (1977). Propositions pour une nouvelle classification des Crustacés, Décapodes, Brachyours. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences, Paris, serie D*, 285, 1049-1052.
- Hartnoll, R. G. (1965). Notes on the marine grapsid crabs of Jamaica. In *Proceedings of the Linnean Society of London* 176 (2), 113-147. Oxford University Press.
- 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 of the Royal Society of London. Series B: 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., Guinot, D., & Forges, B. R. (1996). Contrasting spermatozoal ultrastructure in two thoracotreme crabs, *Cardisoma carnifex* (Gecarcinidae) and

- Varunu litterata* (Grapsidae) (Crustacea: Brachyura). *Invertebrate Reproduction & Development*, 29(2), 111-126. <https://doi.org/10.1080/07924259.1996.9672503>
- Jamieson, B. G. M., & Tudge, C. C. (2000). Crustacea–Decapoda. In ‘Reproductive Biology of Invertebrates. Volume IX, Part C. Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny’. (Ed. BGM Jamieson.) pp. 1-95.
- Kitaura, J., Wada, K., & Nishida, M. (2002). Molecular Phylogeny of Grapsoid and Ocypodoid Crabs with Special Reference to the Genera *Metaplex* and *Macrophthalmus*. *Journal of Crustacean Biology*, 22(3), 682-693. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990281>
- Kumarasamy, P., Sasipriya, M., Ganapiriyar, V., Muthukumaravel, K., Pradhoshini, K. P., Ahmed, M. S., Musthafa, M. S., & Faggio, C. (2022). Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive organization of the Sesamid crab *Muradium tetragonum* (1798)—(Decapoda: Brachyura). *Acta Zoologica*. <https://doi.org/10.1111/azo.12420>
- Lautenschlager, A. D., Brandis, D., & Storch, V. (2010). Morphology and function of the reproductive system of representatives of the genus *Uca*. *Journal of Morphology*, 271(11), 1281-1299. <https://doi.org/10.1002/jmor.10869>
- Matos, E., Matos, P., Corral, L., & Azevedo, C. (2000). Ultraestrutura do espermatozóide de *Ucides cordatus* Linnaeus (Crustacea, Ocypodidae) do litoral norte do Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 17(3), 753-756. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752000000300020>
- Matos, E. R., Santos, M. N. S., Corral, L., & Azevedo, C. (2001). Ultra-estrutura do espermatozóide de *Ocypode quadrata* Fabricius, 1787 (Crustacea, Ocypodidae) do litoral norte do Brasil. *Revista de Ciências Agrárias-Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 36, 131-135.
- 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.
- Ministério do Meio Ambiente. (2022). Portaria GM/MMA nº 300, de 13 de dezembro de 2022. Reconhece a Lista Nacional de Espécies Ameaçadas de Extinção. DOU nº 234, Seção 1, 14 de dezembro de 2022, p. 75-118. <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-gm/mma-n-300-de-13-de-dezembro-de-2022-450425464>. Accessed: 15 Feb. 2023.

- Montanaro, J., Gruber, D., & Leisch, N. (2016). Improved ultrastructure of marine invertebrates using non-toxic buffers. *PeerJ*, 4, e1860.
- Pinheiro, M. A., Santana, W., Rodrigues, E. S., Ivo, C. T., Santos, L. C., Torres, R. A., ... & Dias-Neto, J. (2016). Avaliação dos caranguejos gecarcinídeos (Decapoda: Gecarcinidae). In: Pinheiro, M. & Boos, H. *Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação, 2014*, (pp. 167-181). Sociedade Brasileira de Carcinologia–SBC Porto Alegre.
- 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.
- 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>
- Subramoniam, T. (1993). Spermatophores and sperm transfer in marine crustaceans. *Advances in marine biology*, 29, 129-214. [https://doi.org/10.1016/S0065-2881\(08\)60131-5](https://doi.org/10.1016/S0065-2881(08)60131-5)
- 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*, 269, 166-176. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2017.07.002>
- Tsang, L. M., Schubart, C. D., Ah Yong, S. T., Lai, J. C. Y., Au, E. Y. C., Chan, T.-Y., Ng, P. K. L., & 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: Martin, J.W., Crandall, K.A., Felder, D.L. (Eds.), *Decapod Crustacean Phylogenetics*, Crustacean, Taylor and Francis/CRC Press, Boca Raton, 101, 119.
- Wolfe, J. M., Ballou, L., Luque, R., Watson-Zink, V. M., Ahyong, S. T., Barido-Sottani, J., Chan, T. Y., Chu, K. H., Crandall, K. A., Daniels, S. R., Felder, D. L., Mancke, H., Martin, J. W., Ng, P. K. L., Ortega-Hernández, J., Palacios Theil, E. N., Pentcheff, D., Robles, R., Thoma, B. P., Tsang, L. M., Wetzter, R., Windsor, A. M., Bracken-Grissom, H. D. (2022). Convergent adaptation of true crabs (Decapoda: Brachyura) to a gradient of terrestrial environments. *BioRxiv*, 2022-12.
- Yasuzumi, G. (1960). Spermatogenesis in Animals as Revealed by Electron Microscopy. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 7(1), 73-78. <https://doi.org/10.1083/jcb.7.1.73>

Capítulo IV

Ultraestrutura dos espermatozoides em Grapsoidea (Thoracotremata): famílias Sesarmidae e Plagusiidae

Resumo

O estudo da ultraestrutura dos espermatozoides tem sido uma ferramenta útil para entender as relações de parentesco entre diferentes grupos de decápodes. Neste trabalho, analisamos comparativamente a ultraestrutura dos espermatozoides de espécies de caranguejos das famílias Sesarmidae e Plagusiidae, com o objetivo de identificar características espermáticas robustas a fim de separar estas famílias e espécies e, ao mesmo tempo, entender como os caracteres espermáticos evoluíram nestes grupos filogeneticamente relacionados. O sistema reprodutor masculino de cada espécie foi submetido ao protocolo de rotina para microscopia eletrônica de transmissão em resina Epon-Araldite. As duas famílias são posicionadas em clados irmãos, e compartilham espermatozoides que apresentam vesícula acrossomal constituída por diferentes zonas acrossomais concêntricas, ausência de lamelas concêntricas na zona acrossomal externa, opérculo eletrodenso, centralmente perfurado com botão apical, ausência de aba periopercular e presença de anel espessado eletrodenso. A cápsula eletrolúcida termina na altura da margem anterior do anel espessado. O núcleo é preenchido por cromatina fibrilar e possui braços radiais. Os caranguejos Sesarmidae possuem três zonas acrossomais, ausência do anel opercular acessório, e câmara perforatorial do tipo obdeltóide. As diferenças específicas foram observadas na morfologia, espessura e aspecto das zonas acrossomais interna, externa e periférica. No Plagusiidae, *Plagusia depressa*, foi observado em seu espermatozoide o anel opercular acessório trilaminar, longo e curvado, quatro zonas acrossomais (sendo a zona acrossomal interna raiada) e a câmara perforatorial do tipo panduriforme. Os resultados desse estudo indicam que o acrossoma com três zonas acrossomais e a ausência de anel opercular acessório podem ser sinapomorfias de Sesarmidae. A presença de zona acrossomal raiada em *P. depressa* pode ser considerada uma apomorfia da espécie, e talvez da família, e indica ser este um carácter homoplásico em relação aos Heterotremata.

Palavras-chave: Brachyura, caranguejos, Thoracotremata.

Introdução

A infraordem Brachyura Latreille, 1802 é o grupo mais diversos de crustáceos decápodes, com cerca de 7760 espécies (WoRMS, 2023). Esses caranguejos podem ser encontrados em uma variedade de ambientes, marinhos, dulcícolas e terrestres. A infraordem mostra ampla distribuição geográfica, ocorrendo em todos os continentes do planeta, o que reflete sua capacidade de adaptação a diferentes condições ecológicas (Guinot et al., 2013; Tsang et al., 2014; Wolfe et al., 2019). Baseado na posição das aberturas genitais (gonóporos), Brachyura foi subdividida em três grandes grupos: Podotremata Guinot, 1977, Heterotremata, Guinot, 1977 e Thoracotremata, Guinot, 1977. Os Podotremata são considerados caranguejos primitivos, pois apresentam aberturas genitais localizadas nos apêndices ambulatoriais, ou seja, nas coxas dos terceiros pereópodos em fêmeas, e nas coxas dos quintos pereópodos em machos. Por sua vez, Heterotremata e Thoracotremata foram agrupados em Eubrachyura Saint Laurent, 1980 e são separados pela posição dos gonóporos de machos e fêmeas. As fêmeas de Heterotremata e Thoracotremata possuem as aberturas genitais (gonóporos) localizadas no sexto esternito. Por outro lado, em machos de Heterotremata, os gonóporos se abrem nas coxas do quinto par de pereópodos, enquanto que em Thoracotremata, os gonóporos se abrem no oitavo esternito (Guinot, 1977). Análises morfológicas e filogenéticas moleculares mostraram que Heterotremata e Thoracotremata são considerados grupos-irmãos, o que significa que compartilham um ancestral comum e formam um grupo monofilético (Jamieson, 1994; Jamieson & Tudge, 2000; Tsang et al., 2014, 2022; Wolfe et al., 2022, não revisado por pares). No entanto, a posição das superfamílias de Thoracotremata mostra considerável inconsistência devido as polifilias, principalmente entre os representantes das famílias Grapsoidea MacLeay, 1838 e Ocypodoidea Rafinesque, 1815 (Tsang et al. 2014, 2022; Wolfe et al. 2022). Assim, estudos morfológicos (eg, ultraestrutura do espermatozoide) e moleculares conduzidos com representantes de Thoracotremata podem contribuir com informações importantes para ampliar a compreensão das relações entre os táxons.

A primeira análise molecular de Grapsoidea, com foco em espécies norteamericanas, constatou que Gecarcinidae MacLeay, 1838 deveria ser elevada à família (Schubart, 2000). Posteriormente, Schubart et al. (2002) consideraram Gecarcinidae e Glyptograpsidae Schubart, Cuesta & Felder, 2002 como famílias, mantendo-as de forma temporária dentro de Grapsoidea. Os trabalhos filogenéticos moleculares mais atuais contendo um extenso número de famílias e espécies de Thoracotremata, demonstraram a

proximidade entre os grapsóideos Sesarmidae Dana, 1851, Plagusiidae Dana, 1851 e Gecarcinidae (Tsang et al. 2014, 2022), indicando que as espécies destas famílias possuem um ancestral comum.

É possível verificar que todos os representantes de Thoracotremata compartilham os seguintes caracteres espermáticos ultraestruturais: zonação concêntrica do conteúdo acrossomal, ausência da zona acrossomal raiada, botão apical preenchendo a perfuração central da câmara perforatorial e anel opercular acessório. Entretanto, a presença destes caracteres pode variar significativamente entre alguns táxons (para revisão ver Jamieson 1991, Jamieson et al., 1994; Jamieson & Tudge, 2000). Em estudos morfológicos cladísticos baseados na ultraestrutura dos espermatozoides, apenas espécies de Sesarmidae e Gecarcinidae foram incluídas, sendo que ainda não se conhece a morfologia dos espermatozoides para nenhuma espécie de Plagusiidae (Jamieson, 1991; Jamieson & Tudge, 2000; Jamieson et al., 1995, 1996). Assim, não se sabe se a morfologia espermática desta família está em conformidade com a proximidade dos táxons utilizados nos estudos filogenéticos moleculares previamente citados.

Neste trabalho, foi realizada a descrição da ultraestrutura dos espermatozoides dos Sesarmidae: *Aratus pisonii* H. Milne Edwards, 1837, *Sesarma rectum* Randall, 1840, *Armases angustipes* (Dana, 1852) e *Armases rubripes* (Rathbun, 1897) e do Plagusiidae: *Plagusia depressa* (Fabricius, 1775), buscando comparar os resultados espermáticos com espécies descritas na literatura científica, a fim de caracterizar os caracteres espermáticos destas famílias e de suas espécies. Além disso, utilizamos parte da filogenia molecular (Capítulo I), integrada a ultraestrutura do espermatozoide, a fim de identificar caracteres morfológicos com sinal filogenético para entender a evolução da ultraestrutura das células germinativas masculinas nestas famílias intimamente relacionadas.

Material e Métodos

Animais e processamento ultraestrutural

Machos maduros (N=5) de cada espécie foram coletados manualmente em áreas entre-marés de costão rochoso, praias rochosas, manguezais e margens de riachos em áreas de restinga, entre 2013 a 2022, na costa brasileira do Atlântico Sul. *P. depressa* foi amostrada em Ipojuca, Porto de Galinhas no estado de Pernambuco (PE), *A. pisonii* foram obtidos nos municípios de Sauípe (PE), São Vicente e Cananeia, estado de São Paulo (SP) e *S. rectum*, *Ar. angustipes* e *Ar. rubripes* foram capturados em diferentes praias em

Ubatuba, Ilha comprida e Cananeia (SP).

Os animais coletados foram dissecados e amostras da região média do vaso deferente (1mm^3) foram fixados em Marfem (PHEM 1.5X + glutaraldeído 2.5% + sacarose), em água destilada e solução Karnovsky (paraformaldeído 2% + glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH = 7.4), por 4 horas (Karnovsky, 1965, Montanaro et al., 2016; Garcia Bento et al., 2018). Após três banhos em tampão apropriado para cada fixador, as amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1%, com o respetivo tampão para cada tipo de amostra por duas horas. Os materiais foram contrastados “Em Bloc” com acetato de uranila 1% (overnight, 4°C). A desidratação foi realizada em sequência progressiva de acetona (50 a 95%) e as amostras foram embebidas e incluídas em resina Epon – Araldite. Os cortes ultra-finos (50 – 60 nm) foram obtidos no ultramicrotomo Leica UC7, contrastadas com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo 0,5%. As grades com os cortes foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM – 1010, com feixe eletrônico, acelerado a 80KV, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV, UNESP – Campus de Jaboticabal.

A razão entre o comprimento e a largura (C/L) da vesícula acrossomal foi calculada com base em medidas tomadas na maior extensão entre o botão apical na região do opérculo, a ser denominado de polo espermático anterior ou apical, e as regiões basais da vesícula acrossomal e a câmara perforatorial, denominada de polo posterior ou basal, sobre o núcleo, para o comprimento. A largura foi considerada a maior medida latitudinal, muitas vezes equatorial da vesícula acrossomal. A nomenclatura utilizada na classificação das estruturas espermáticas foi baseada nos trabalhos de Jamieson (1994) e Jamieson & Tudge (2000). Para a morfologia da câmara perforatorial seguiu-se as formas gregarinas propostas por Clopton (2004), com a modificação em que as medidas para a forma foram sempre realizadas por delimitação com uma linha transversal no final anterior do anel espessado.

Análise filogenética e reconstrução ancestral de caráter

A proposta filogenética utilizada encontra-se apresentada na sua totalidade no capítulo I da presente tese. Contudo, o filograma com o clado maior, contendo as famílias Sesarmidae, Gecarcinidae e Plagusiidae foi obtido com edição realizada por meio do software Mesquite V3.7 (Maddison & Maddison, 2021). Adicionalmente, uma matriz de dados espermáticos ultraestruturais foi produzida, para a seleção de caracteres robustos

para separar as famílias de interesse. Para designar o estado dos caracteres, foram atribuídos números, tais como: Caráter 1 “Número de zonas acrossomais”: 3 zonas (0); 4 zonas (1), Caráter 2 “Anel opercular acessório”: Ausente (0); Presente (1), Caráter 3 “Zona acrossomal raiada”: Ausente (0); Presente (1), Caráter 4 “Aba periopercular”. Nas espécies com dados insuficientes, o status atribuído foi o símbolo “?” (Tabela 1).

Resultados

Morfologia geral dos espermatozoides

De maneira geral, *A. pisonii*, *S. rectum*, *Ar. angustipes*, *Ar. rubripes* e *P. depressa* exibem espermatozoides com morfologia típica observada em Thoracotremata. A vesícula acrossomal é esférica ou elíptica, mais longa do que larga, constituída por diferentes camadas ou zonas concêntricas, a qual está envolta quase que completamente pela região nuclear, formando uma taça. Na zona acrossomal externa não são observadas lamelas concêntricas. A câmara perforatorial é preenchida internamente por túbulos perforatoriais. A unidade de membrana da câmara perforatorial é contínua com a unidade de membrana da cápsula (membrana da vesícula acrossomal), portanto, quando ocorre a invaginação do citoplasma subacrossomal, começa a câmara perforatorial. Na base da câmara perforatorial (polo basal ou posterior), ocorre o anel espessado na margem interior da vesícula acrossomal e em contato com o material eletrolúcido da cápsula, o qual é observado somente até a margem anterior do anel. A cápsula é um espaço eletrolúcido delimitado externamente por uma unidade de membrana (membrana da vesícula acrossomal), em contato com o citoplasma e que se prolonga sobre o opérculo. A cápsula eletrolúcida tem sua face interna em contato com as camadas concêntricas da vesícula acrossomal, e especificamente a zona acrossomal periférica termina na margem do opérculo. O opérculo eletrodenso é centralmente perfurado e o núcleo porta braços radiais delgados (Esquema 1).

Família Sesarmidae

Aratus pisonii

Em corte longitudinal, o acrossomo de *A. pisonii* é elíptico e proporcionalmente pequeno em relação ao núcleo, com razão acrossomal de $1,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$. O núcleo é preenchido por cromatina fibrosa e mostra a presença dos braços radiais. A câmara

perforatorial é finamente obdeltóide, com ápice arredondado e seu corpo é quase todo preenchido por túbulos perforatoriais paralelos (Fig. 1A). O opérculo é delgado, centralmente perfurado, com pequeno botão apical e abaixo deste encontra-se uma delgada camada subopercular triangular, sem anel opercular acessório, e menos eletrodensa que o opérculo (Fig. 1A e B). Nas suas margens não existe a aba periopercular e observa-se delgada cápsula acrossomal, com sua unidade de membrana recobrindo também o botão apical (Fig. 1B e C). O acrossomo apresenta três zonas concêntricas, sendo a mais interna eletrodensa, estreita e levemente arredondada. A zona acrossomal externa é mais volumosa, com aspecto finamente granular e menos eletrodensa do que a interna. A última zona é periférica, sendo delgada, com a menor eletrodensidade que todas as zonas acrossomais. A mesma é delimitada por uma capa eletrodensa (Fig. 1C). Na base da câmara perforatorial, nota-se a presença do anel espessado floculado, associado ao material eletrolúcido da cápsula em contato exclusivo pela zona acrossomal externa (Fig. 1D). Em corte transversal, sobre o terço superior da vesícula acrossomal, comparado com o corte na altura do anel espessado floculado, nota-se a distribuição diferenciada das zonas acrossomais, sendo somente a externa e a periférica presentes na região do anel (Fig. 1E e F).

Armases angustipes

Os espermatozoides de *Arm. angustipes* tem vesícula acrossomal ligeiramente mais longa que larga, com razão acrossomal de $1,1 \pm 0,03 \mu\text{m}$. O núcleo com cromatina fibrilar porta braços radiais laterais (Fig. 2A). A câmara perforatorial é do tipo profundamente obdeltóide, preenchida em sua região central por microtúbulos paralelos e seu ápice mostra bordas retas. O opérculo é saliente com ápice arredondado e amplo, centralmente perfurado, com suas extremidades levemente arredondadas (Fig. 2A e B). No local da perfuração opercular encontra-se o botão apical arredondado. Nota-se na região subopercular a ausência da aba periopercular e o anel opercular acessório sendo que a aba periopercular e o anel opercular acessório, junto ao material subacrossomal são ausentes. Tal região é delgada e relembra a figura de um triângulo em ambos os lados da câmara perforatorial (Fig. 2A e B). A cápsula acrossomal, com sua unidade de membrana recobre o opérculo e envolve a vesícula acrossomal que é constituída por três zonas acrossomais, sendo a interna mais eletrodensa, espessa e arredondada, ocorrendo desde a região onde se encontra o material subopercular até próximo à base da câmara perforatorial, na altura da margem anterior do anel espessado (Fig. 2C). A zona

acrossomal externa é ampla e menos eletrodensa que a interna, sendo granulosa em toda sua área. A zona acrossomal periférica é espessa, menos eletrodensa que as demais zonas e termina na margem posterior do anel espessado (Fig. 2C e D). A zona acrossomal periférica é delimitada pelo material eletrolúcido da cápsula, sendo que este material é observado até a altura da região anterior do anel espessado (Fig. 2C). A base da câmara perforatorial é curva, com anel espessado floculado na margem interna da vesícula acrossomal, em contato com o material eletrolúcido da cápsula (Fig. 2D). Em corte transversal no terço superior da vesícula acrossomal, observa-se a câmara perforatorial, a zona acrossomal interna, a externa e a periférica (Fig. 2E). O corte próximo à base da câmara perforatorial exhibe o anel espessado e as zonas acrossomais externa e periférica (Fig. 2F).

Armases rubripes

Os espermatozoides de *Arm. rubripes* possuem vesícula acrossomal mais larga do que longa, com razão acrossomal de $1,2 \pm 0,3 \mu\text{m}$. O núcleo contém braços radiais delgados e cromatina fibrosa. A câmara perforatorial é obdeltóide, com ápice arredondado e base afilada (Fig. 3A). O opérculo é centralmente perfurado, delgado, sendo que abaixo deste observa-se a delgada região subopercular. O anel opercular acessório e a aba periopercular estão ausentes. Na região central acima do opérculo, nota-se o botão apical eletrodenso e arredondado (Fig. 3A e B). A vesícula acrossomal é formada por três zonas acrossomais: a interna, eletrodensa de aspecto aliforme; a externa, menos eletrodensa que a interna e com duas áreas arredondadas horizontais no polo anterior, justaposta a margem do opérculo e a posterior, na altura do anel espessado (devido a morfologia aliforme da zona interna), e a zona periférica delgada e levemente mais eletrodensa que a zona acrossomal externa (Fig. 3C). Envolvendo a base da câmara perforatorial, observa-se o anel espessado floculado na face interna da membrana da vesícula acrossomal. O anel espessado está em contato com o material eletrolúcido da cápsula e com a zona acrossomal externa. A zona acrossomal interna tem início na margem anterior deste anel (Fig. 3D). A delgada cápsula acrossomal ocorre sobre todo o opérculo e botão apical, e termina na região anterior do anel espessado, onde o material eletrolúcido desaparece (Fig. 3C e D). Em corte transversal mais anterior à vesícula acrossomal, nota-se as diferentes zonas acrossomais (Fig. 3E). Quando em corte no polo posterior, na altura da base da câmara perforatorial, nota-se o anel espessado em contato com a zona acrossomal externa (Fig. 3F).

Sesarma rectum

Em *S. rectum*, os espermatozoides são constituídos pela vesícula acrossomal com razão acrossomal $1,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$. O núcleo, apesar de amplo, parece proporcionalmente menor em relação ao acrossomo e o volume da célula (Fig. 4A). A câmara perforatorial é profundamente obdeltóide, com ápice arredondado, pouco saliente na porção central do opérculo perfurado. O opérculo é delgado, com suas porções mais centrais formando um domo alto em direção à região mais anterior da vesícula acrossomal e suas extremidades são levemente curvadas, fazendo limite com as margens laterais do acrossoma (Fig. 4A e B). Abaixo do opérculo, observa-se a delgada camada da região subopercular com forma triangular, que ocorre até a metade da margem lateral opercular. A aba periopercular e o anel opercular acessório estão ausentes. O botão apical pequeno, triangular e eletrodensa está sobre a perfuração do opérculo (Fig. 4B - D). A vesícula acrossomal exibe zonas concêntricas, sendo a interna arredondada, marcadamente espessa e mais eletrodensa, a qual ocorre anteriormente desde à margem da região subopercular até próximo a margem anterior do anel espessado, junto da base da câmara perforatorial. A zona acrossomal externa é a mais ampla, menos eletrodensa que a interna, com formato aliforme, devido a duas subzonas menos eletrodensas. Estas subzonas são horizontais, sendo uma anterior, espessa e arredondada, no corte longitudinal, justaposta ao opérculo e a subzona horizontal posterior, a qual está junto ao anel espessado. As subzonas têm contato com a zona acrossomal interna, sendo somente a anterior com contato adicional com a camada acrossomal periférica (Fig. 4C - D). A zona acrossomal periférica é delgada, menos eletrodensa, limitada pela unidade de membrana da vesícula acrossomal, terminando na margem posterior do anel espessado, também associado a esta unidade de membrana (Fig. 4C - F). A cápsula acrossomal eletrolúcida é delgada e termina na margem anterior do anel espessado (Fig. 4C - D). Em corte transversal equatorial, nota-se as zonas acrossomais concêntricas (Fig. 4E), enquanto que a subzona posterior circunda a base da câmara perforatorial, em conjunto com o anel espessado e a cápsula (Fig. 4F).

Família Plagusiidae

Plagusia depressa

Em corte longitudinal, o espermatozoide de *P. depressa* apresenta o núcleo no polo posterior com vários braços laterais delgados, também preenchidos com cromatina fibrosa. A vesícula acrossomal é esférica, com razão acrossomal de $1,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$. A

câmara perforatorial é estreitamente panduriforme, com ápice retilíneo (Fig. 5A). O opérculo é estreito em relação à superfície da vesícula acrossomal. Adicionalmente, este mostra-se espesso e centralmente perfurado, com o pequeno botão apical triangular que se projeta anteriormente para além da vesícula acrossomal, recoberto pela unidade de membrana da cápsula (Fig. 5A e B). Abaixo do opérculo encontra-se a delgada e menos eletrodensa região subopercular, a qual na sua margem apresenta o anel opercular acessório longo e curvo (Fig. 5B). Esta estrutura é trilaminar, com a camada central menos eletrodensa que as demais. A aba periopercular é ausente na margem do opérculo e cápsula (Fig. 5B e C). A vesícula acrossomal tem quatro zonas concêntricas, sendo a interna raiada ou com raios acrossomais, em direção à zona acrossomal intermediária, a qual é menos eletrodensa (Fig. 5C e D). A zona acrossomal externa é homogênea, ampla, de aspecto ligeiramente mais eletrodensa que a zona acrossomal intermediária e é a mais espessa dentre todas. A quarta camada, a zona acrossomal periférica, é delgada e mostra-se menos eletrodensa que todas as zonas acrossomais (Fig. 5C). A cápsula acrossomal recobre toda a vesícula acrossomal, opérculo e botão opercular, desaparecendo na região anterior do anel espessado (Fig. 5C, E). Na base da câmara perforatorial está o anel espessado, associado ao material eletrolúcido da cápsula e a unidade de membrana da vesícula acrossomal (cápsula). Esta unidade de membrana é contínua e forma a câmara perforatorial (Fig. 5E). O corte transversal na altura média da câmara perforatorial confirma a morfologia observada em cortes longitudinais, com a presença da câmara perforatorial e as quatro zonas acrossomais com diferentes eletrodensidades (Fig. 5F). Em corte transversal próximo a base da câmara perforatorial, a área eletrolúcida da cápsula é envolvida pelo anel espessado delgado e floculado (Fig. 5G).

Análise filogenética e reconstrução ancestral de caráter

A árvore evolutiva obtida por máxima verossimilhança fornece suporte à monofilia da filogenia formada por Sesarmidae, Gecarcinidae e Plagusiidae apresentada no capítulo I. O clado composto por essas três famílias é dividido em dois maiores clados, com valores de suporte expressos em bootstrap. Os táxons de Sesarmidae estão incluídos no primeiro clado e são agrupados como irmãos do segundo clado, que é formado por Gecarcinidae e Plagusiidae. Os gecarcínídeos e plagusiídeos são considerados grupo-irmão nesta filogenia (Fig. 6).

A ausência de zona acrossomal raiada e da aba periopercular são caracteres plesiomórficos do clado formado por Sesarmidae, Gecarcinidae e Plagusiidae. A presença

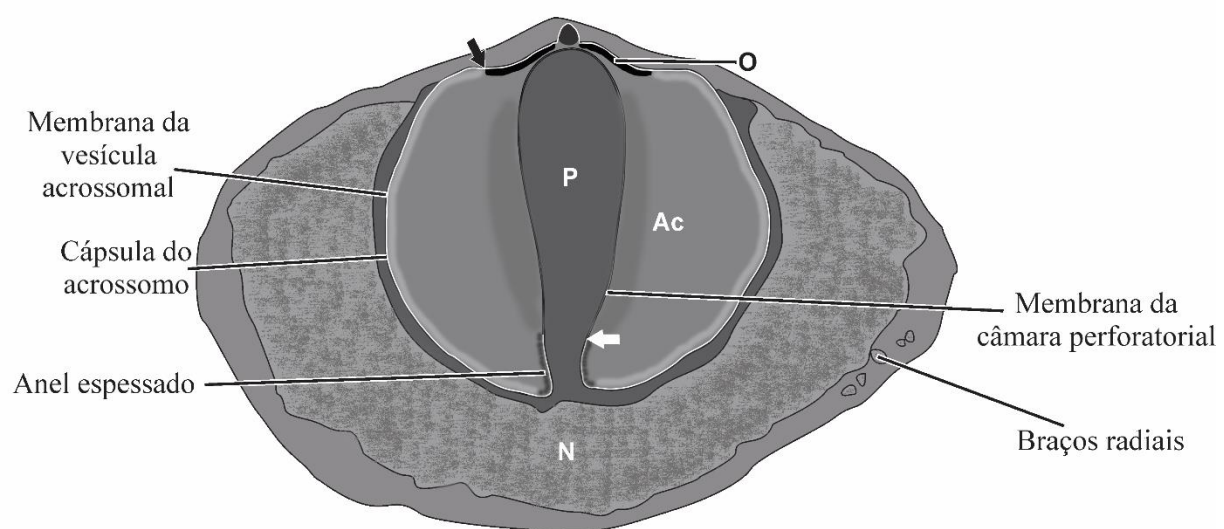
de três zonas acrossomais e a ausência do anel opercular acessório são sinapomorfias de Sesarmidae. A zona acrossomal raiada é uma apomorfia de *P. depressa*, sendo esta característica ausente nas demais espécies analisadas neste capítulo de tese (Fig. 7 – 10).

Tabela, figuras e legendas

Tabela 1. Matriz com os estados dos caracteres espermáticos, sendo “número de zonas acrossomais” (0) 3 zonas e (1) 4 zonas, “anel opercular acessório”, sendo (0) ausente e (1) presente, “zona acrossomal raiada”, sendo (0) ausente e (1) presente e “aba periopercular”, sendo (0) ausente e (1) presente. ? = informações não disponíveis.

Espécies	Família	Número de zonas acrossomais	Anel opercular acessório	Zona acrossomal raiada	Aba periopercular
<i>Parasesarma catenatum</i> ²	Sesarmidae	0	0	0	0
<i>Parasesarma erythrodictyla</i> ²		0	0	0	0
<i>Episesarma versicolor</i>		?	?	?	?
<i>Aratus pisonii</i> ¹		0	0	0	0
<i>Armases cinereum</i>		?	?	?	?
<i>Armases angustipes</i> ¹		0	0	0	0
<i>Armases rubripes</i> ¹		0	0	0	0
<i>Sesarma reticulatum</i>		?	?	?	?
<i>Sesarma rectum</i> ¹		0	0	0	0
<i>Metasesarma obesum</i>		?	?	?	?
<i>Cardisoma crassum</i>	Gecarcinidae	?	0	?	0
<i>Cardisoma guanhumi</i> ¹		1	1	0	1
<i>Cardisoma carnifex</i> ³		1	1	0	1
<i>Gecarcoidea natalis</i>		?	?	?	1
<i>Gecarcoidea lalandii</i>		?	?	?	?
<i>Johngarthia lagostoma</i> ¹	Plagusidae	1	1	0	?
<i>Plagusia squamosa</i>		?	?	?	1
<i>Plagusia depressa</i> ¹		1	1	1	?
<i>Euchirograpsus danielae</i>	Dromiidae (grupo externo)	?	?	?	0
<i>Lauridromia dehaani</i>		?	?	?	?
<i>Conchoecetes artificiosus</i>	Dromiidae (grupo externo)	?	?	?	?

¹ Presente estudo; ²Jamieson (1991); ³Jamieson et al. (1996)

Esquema 1

Esquema 1. Diagrama geral dos espermatozoides de *A. pisonii*, *S. rectum*, *Ar. angustipes*, *Ar. rubripes* e *P. depressa*. Ac= vesícula acrossomal; N= núcleo; O= opérculo; P= câmara perforatorial; Seta preta= início da cápsula acrossomal; Seta branca= término da cápsula acrossomal.

Figura 1

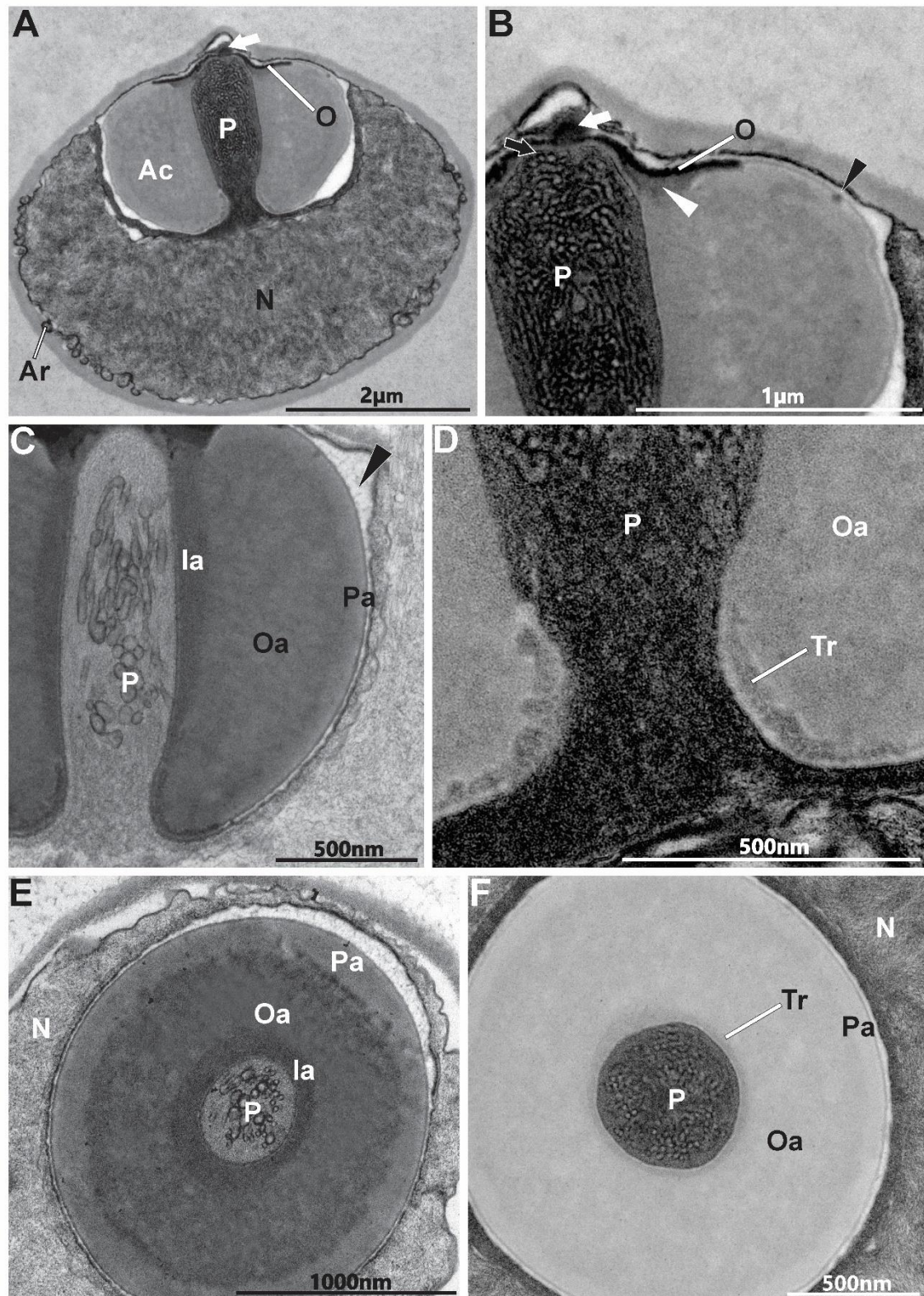


Figura 1. Aspectos ultraestruturais dos espermatozoides de *Aratus pisonii*. **A.** Em secção longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial observa-se que o espermatozoide é formado pela câmara perforatorial, pela vesícula acrossomal, com a presença do botão apical (seta) e pela região nuclear. Note que nesta espécie o núcleo é bastante volumoso e mostra a presença dos braços radiais. **B.** Detalhe do ápice acrossomal, exibindo o opérculo eletrodenso perfurado, região subopercular (cabeça de seta branca) e o ápice da câmara perforatorial (seta preta). Note a presença do botão apical (seta branca) e da cápsula acrossomal (cabeça de seta preta). **C.** Observe a câmara perforatorial, seguida pela zona acrossomal interna, zona acrossomal externa e a periférica. Note ainda a cápsula do acrossoma (cabeça de seta). **D.** Detalhe da base da câmara perforatorial, exibindo o anel espessado floculado, circundado pela zona acrossomal externa. **E.** O corte transversal próximo à terça parte superior do acrossomo mostra a zona acrossomal interna, a externa e a periférica. **F.** Em corte transversal próximo a base da câmara perforatorial observa-se o anel espessado, a zona acrossomal externa e a periférica. Ac= vesícula acrossomal; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Tr= anel espessado.

Figura 2

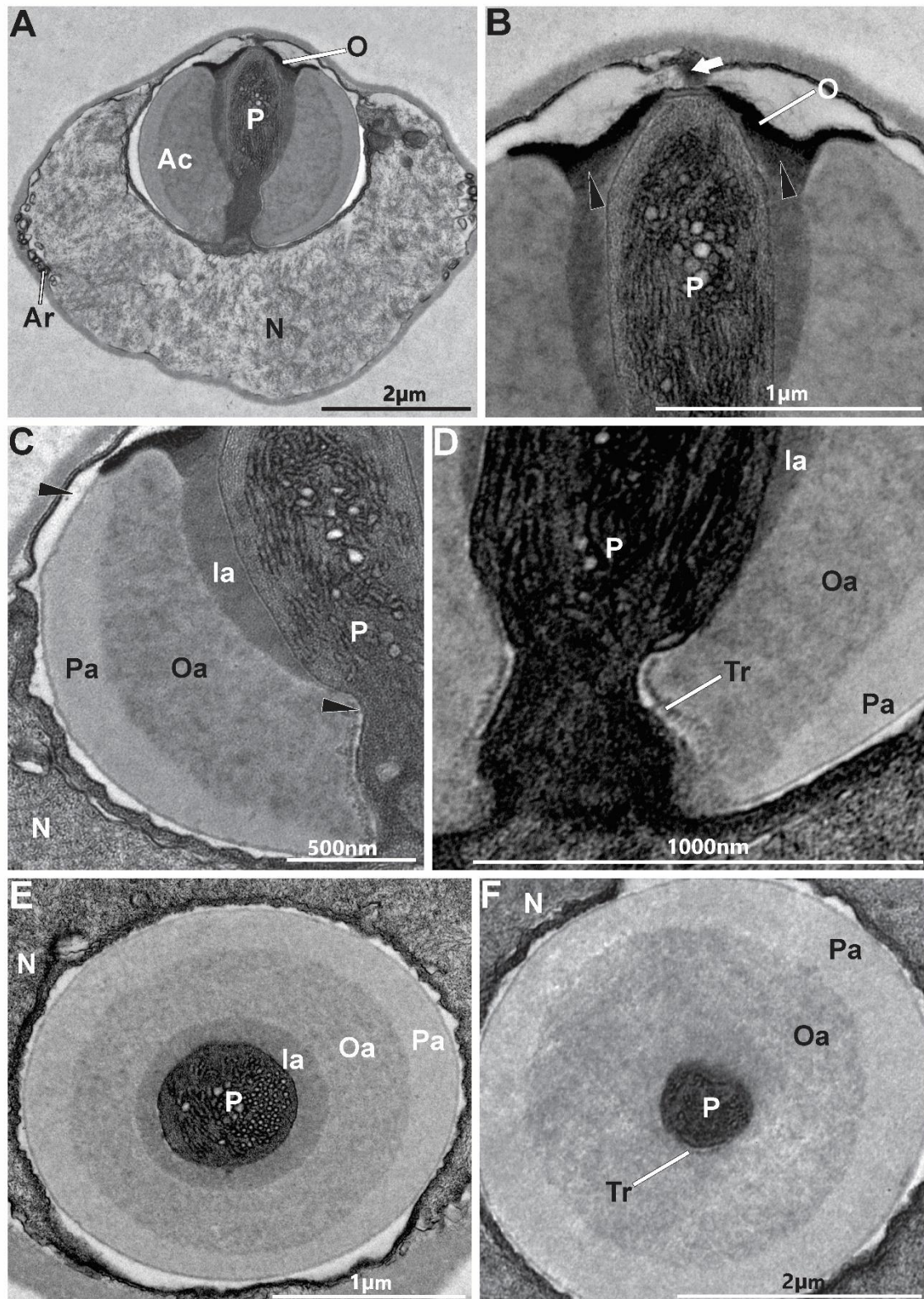


Figura 2. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Armases angustipes*. **A.** Seção longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial, o qual exhibe espermatozoide formado pela câmara perforatorial, vesícula acrossomal, opérculo perfurado e região nuclear. Note os braços radiais. **B.** Ápice do acrossoma mostrando o opérculo eletrodenso perfurado, região subopercular (cabeça de seta), e o botão apical (seta). **C.** Detalhe das zonas acrossomais. Note a zona acrossomal interna adjacente à câmara perforatorial, a zona acrossomal externa e a periférica. A cápsula acrossomal termina na margem anterior do anel espessado onde inicia a zona interna do acrossoma (cabeças de setas). **D.** Detalhe da base da câmara perforatorial envolta pelo anel espessado floculado. Observe ainda porções das zonas acrossomais interna, externa e periférica. **E.** Em corte transversal próximo à terça parte superior do acrossomo, nota-se a zona acrossomal interna circundando a câmara perforatorial, a qual é circundada pela zona acrossomal externa. A zona acrossomal periférica mais espessa e menos eletrodensa. **F.** A secção transversal próxima à terça parte do acrossomo exhibe o anel espessado, a zona acrossomal externa e a periférica. Ac= vesícula acrossomal; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Tr= Anel espessado.

Figura 3

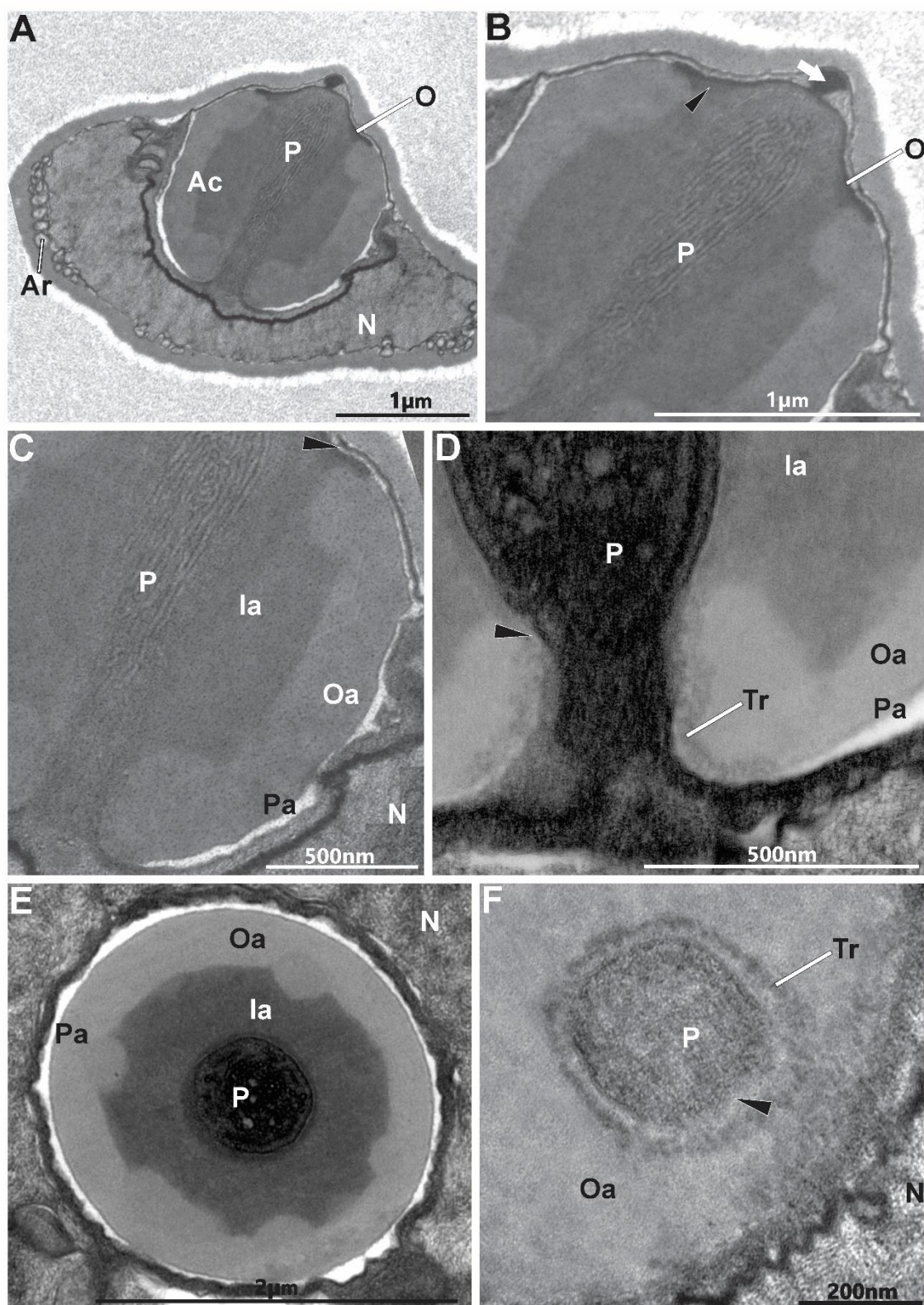


Figura 3. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Armases rubripes*. **A.** Em corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial nota-se o espermatozoide formado pela câmara perforatorial, vesícula acrossomal, opérculo e núcleo, com a presença dos braços radiais. **B.** Ápice da vesícula acrossomal exibindo opérculo eletrodenso, região subopercular (cabeça de seta), e o botão apical (seta). **C.** Câmara perforatorial envolvida pela zona acrossomal interna com formato aliforme, seguida pelas zonas acrossomais externa e a periférica. Note a cápsula acrossomal tendo início nas margens do opérculo (cabeça de seta). **D.** Detalhe da base da câmara perforatorial envolta pelo anel espessado floculado. Observe ainda porções das zonas acrossomais interna, externa, periférica e a cápsula acrossomal (cabeça de seta) terminando junto à região anterior do anel espessado. **E.** O corte transversal na terça porção superior do acrossomo exibe a câmara perforatorial central e esférica, circundada pelas zonas acrossomais. Note o formato irregular da zona acrossomal interna, devido a sua morfologia aliforme. **F.** Em corte transversal próximo a base da câmara perforatorial observa-se o anel espessado, a cápsula acrossomal (cabeça de seta) e a zona acrossomal externa. Ac= vesícula acrossomal; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Tr= Anel espessado.

Figura 4

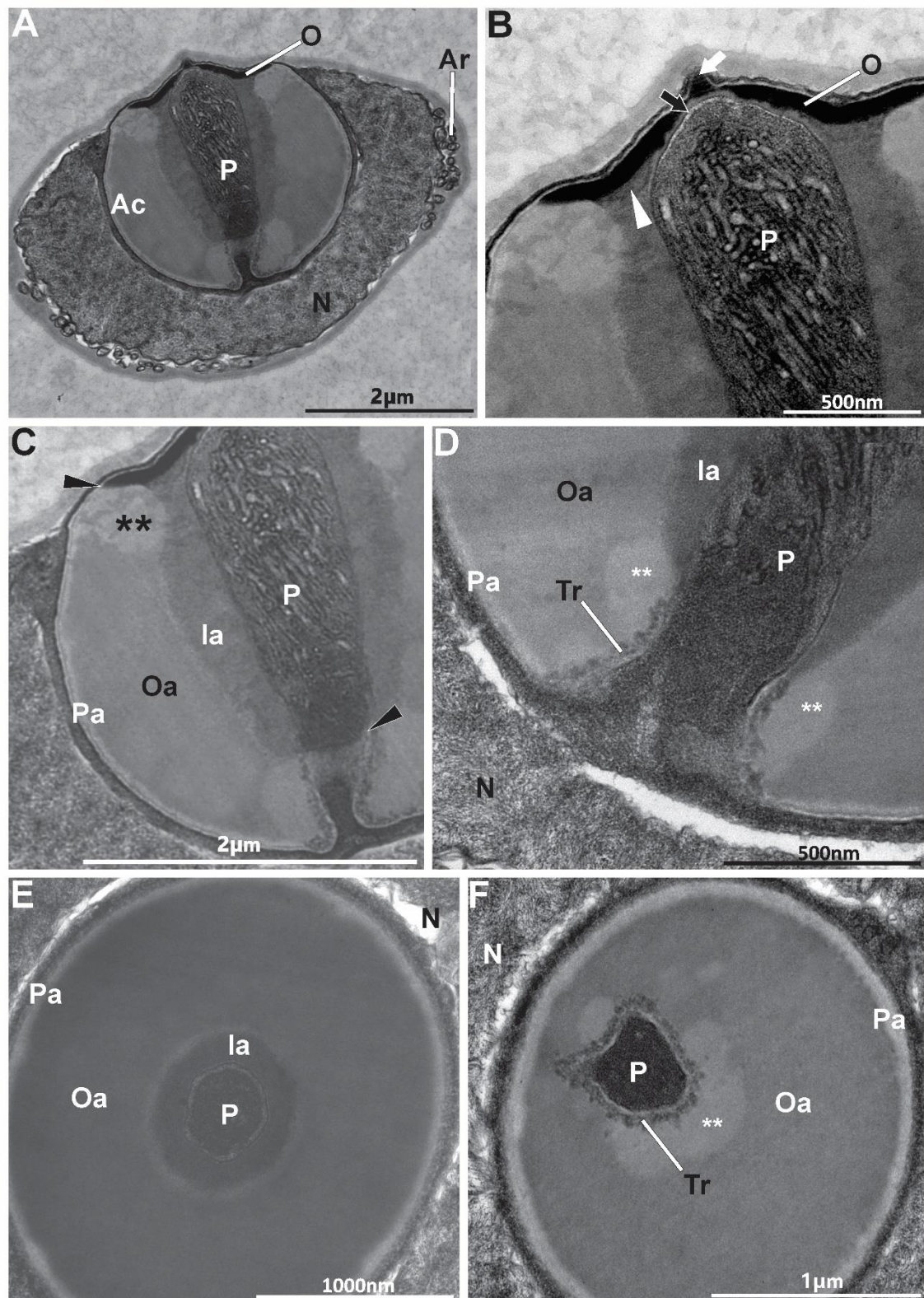


Figura 4. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Sesarma rectum*. **A.** Corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial, o qual exhibe espermatozoide formado pela câmara perforatorial, vesícula acrossomal e região nuclear. Note o núcleo com a presença dos braços radiais. **B.** Ápice acrossomal exibindo o opérculo eletrodenso perfurado, a região subopercular (cabeça de seta), o ápice da câmara perforatorial (seta preta) e o botão apical (seta branca). **C.** Observe a câmara perforatorial, seguida pela zona acrossomal interna, a zona acrossomal externa e a periférica. Note ainda a zona anterior espessa e arredondada, justaposta ao opérculo (**) e a cápsula acrossomal (cabeças de seta). **D.** Detalhe da base da câmara perforatorial, exibindo o anel espessado floculado (setas), circundado pela zona horizontal posterior (**), a qual é seguida pela zona acrossomal externa. **E.** O corte transversal próximo à terça parte superior da vesícula acrossomal mostra a zona acrossomal interna, externa e periférica. **F.** Em corte transversal próximo a base da câmara perforatorial observa-se o anel espessado, a zona acrossomal externa e a periférica. Note ainda resquícios da zona posterior (**) em contato com o anel espessado. Ac= vesícula acrossomal; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Tr= Anel espessado.

Figura 5

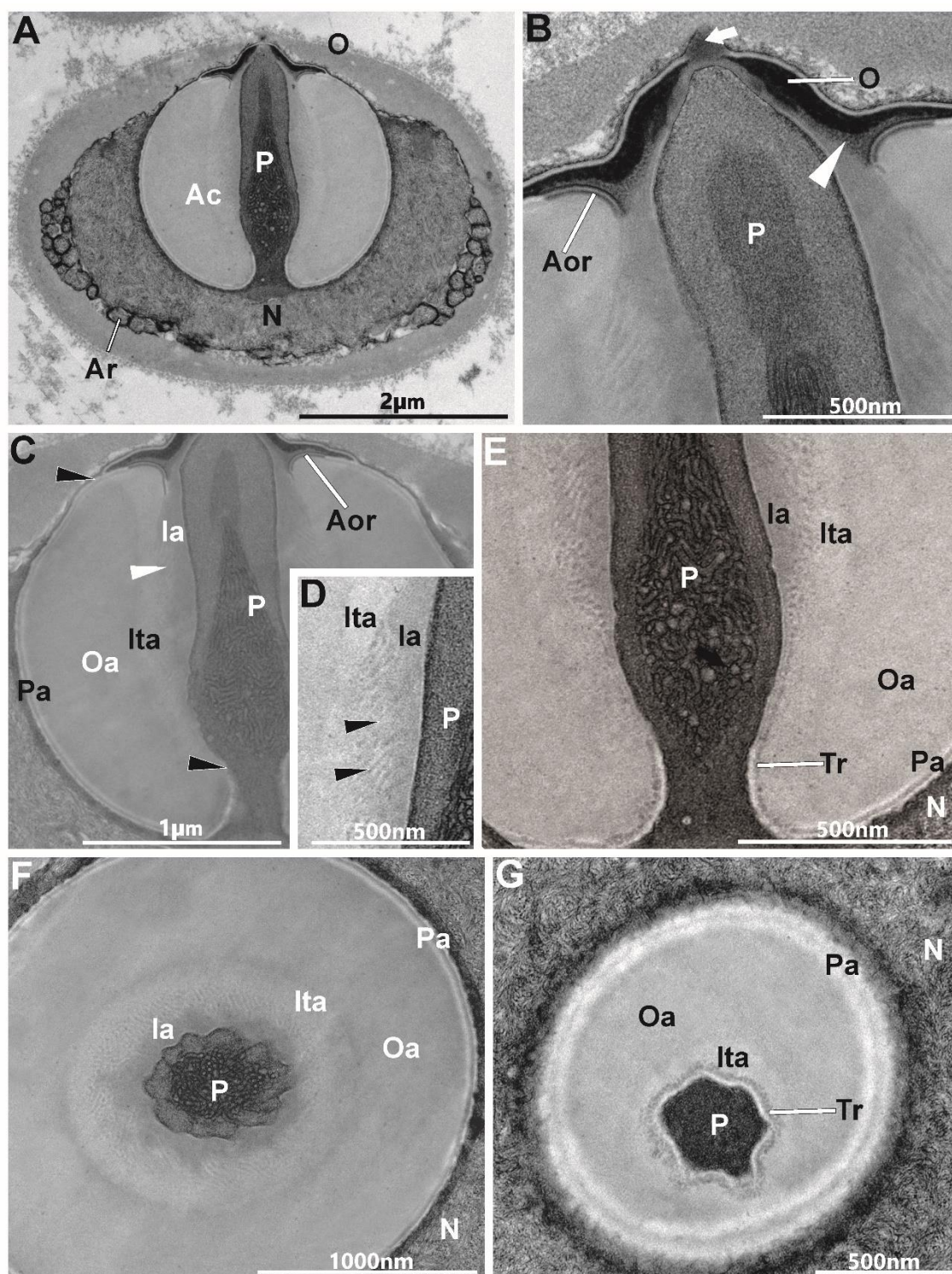


Figura 5. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Plagusia depressa*. **A.** Em secção longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial nota-se que o espermatozoide é formado pela câmara perforatorial, vesícula acrossomal, opérculo perfurado e núcleo. Note a presença dos braços radiais. **B.** Detalhe do ápice do acrossomo mostrando o opérculo eletrodenso perfurado, a região subopercular (cabeça de seta), e o botão apical (seta). Observe que esta espécie possui anel opercular acessório logo abaixo da região subopercular. **C.** Câmara perforatorial envolvida pela zona acrossomal interna, seguida pelas zonas intermediária, externa e periférica. Note os raios da zona acrossomal interna (cabeça de seta branca) e a cápsula acrossomal envolvendo a unidade de membrana do acrossomo, terminando na região anterior do anel espessado (cabeças de seta preta). **D.** Detalhe da zona acrossomal interna exibindo os raios (cabeças de seta) que se projetam em direção à zona acrossomal intermediária. **E.** Detalhe da base da câmara perforatorial envolta pelo anel espessado eletrodenso floculado. Note as zonas acrossomais interna, intermediária, externa e periférica. **F.** O corte transversal próximo à região intermediária da vesícula acrossomal exibe a câmara perforatorial, seguida pelas zonas acrossomais. **G.** Em corte transversal próximo a base da câmara perforatorial observa-se o anel espessado, a zona acrossomal intermediária, a externa e a periférica. Ac= vesícula acrossomal; Aor= anel opercular acessório; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; Ita= zona acrossomal intermediária; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Tr= anel espessado.

Figura 6

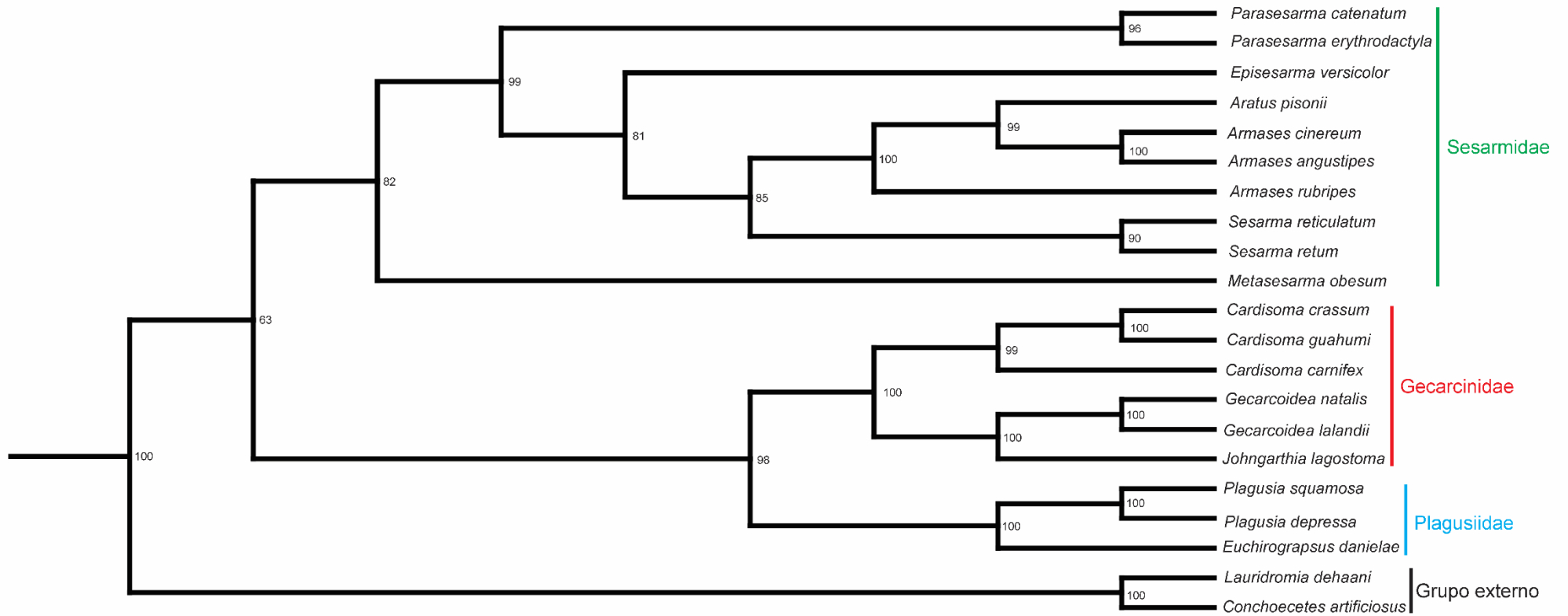


Figura 6. Cladograma obtido a partir da Máxima verossimilhança. O suporte de clado está representado por bootstrap.

Figura 7

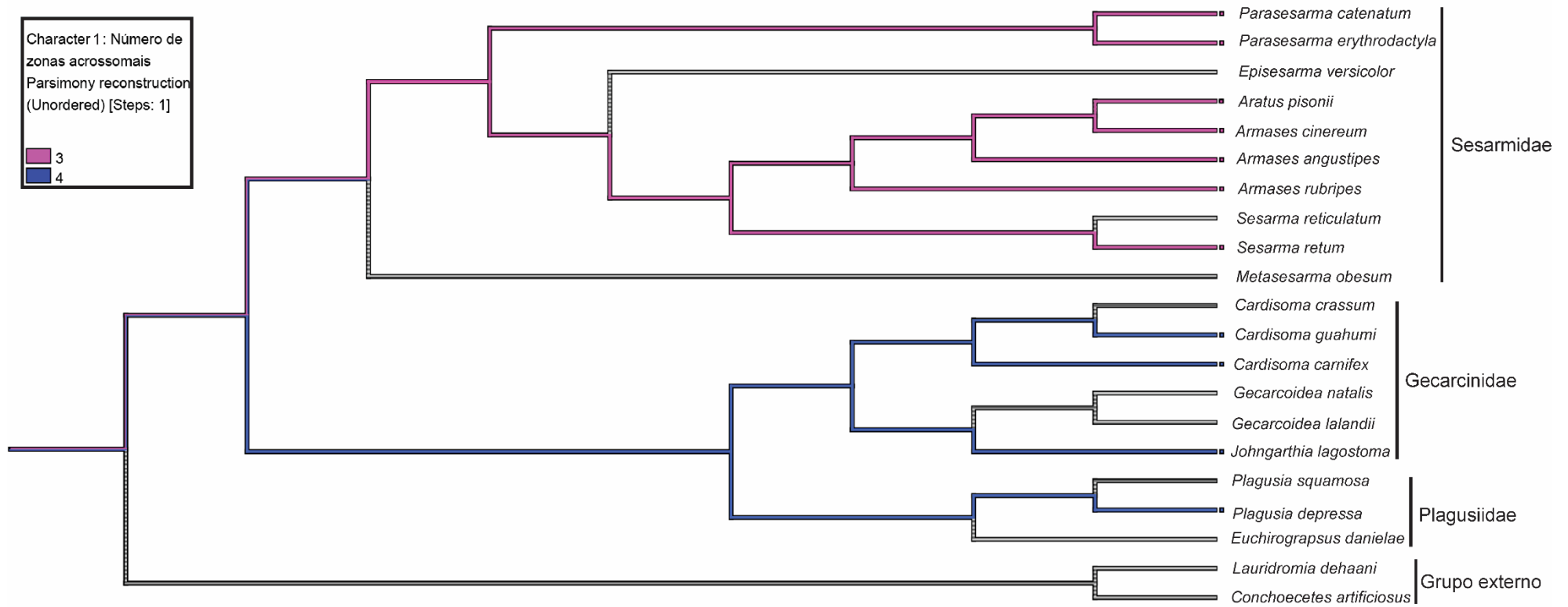


Figura 7. Mapeamento do caráter “número de zonas acrossomais”. Este cladograma mostra a reconstrução de estado ancestral do caráter “número de zonas acrossomais, sendo que se observa em rosa um número de três zonas e azul quatro zonas. O ancestral comum do clado poderia apresentar ambas as condições do caráter, 3 zonas agrupam os sesarmídeos e quatro em táxons de Gecarcinidae e Plagusiidae.

Figura 8

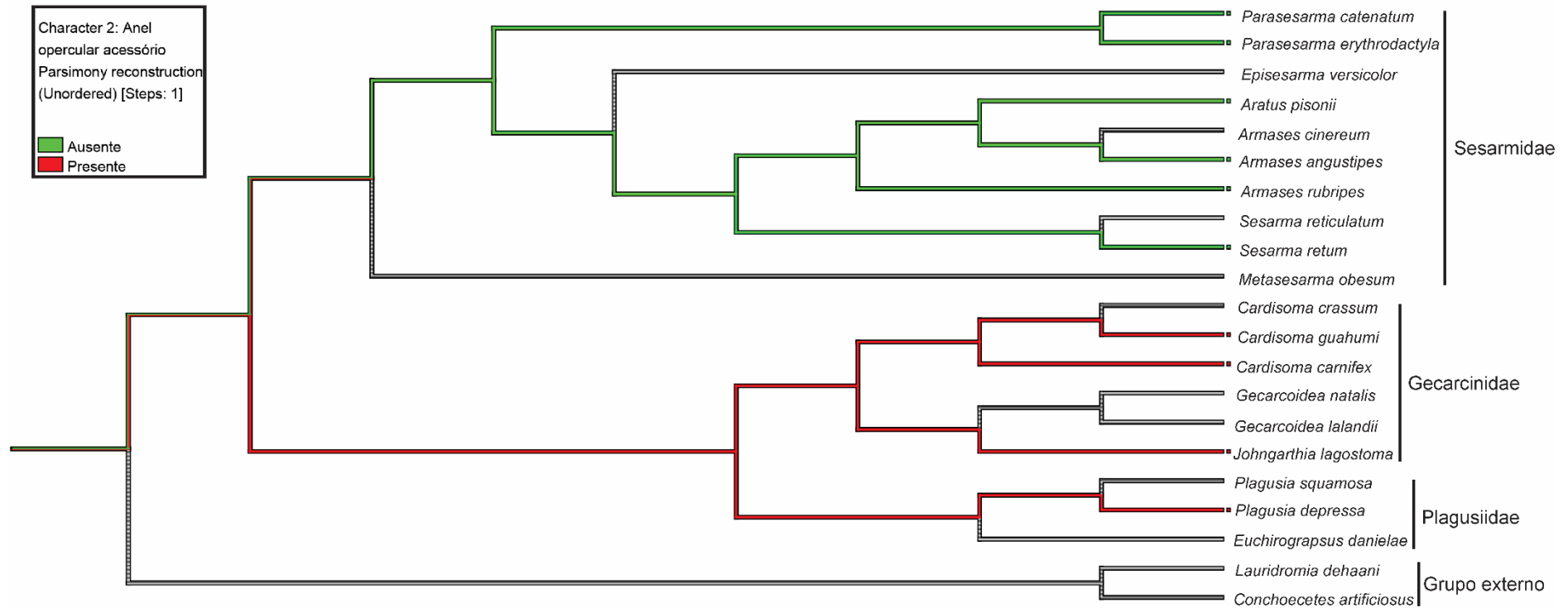


Figura 8. Mapeamento do caráter “anel opercular acessório”. Anel opercular acessório ausente em Sesarmidae (verde) e presente em Gecarcinidae e Plagusiidae (vermelho).

Figura 9

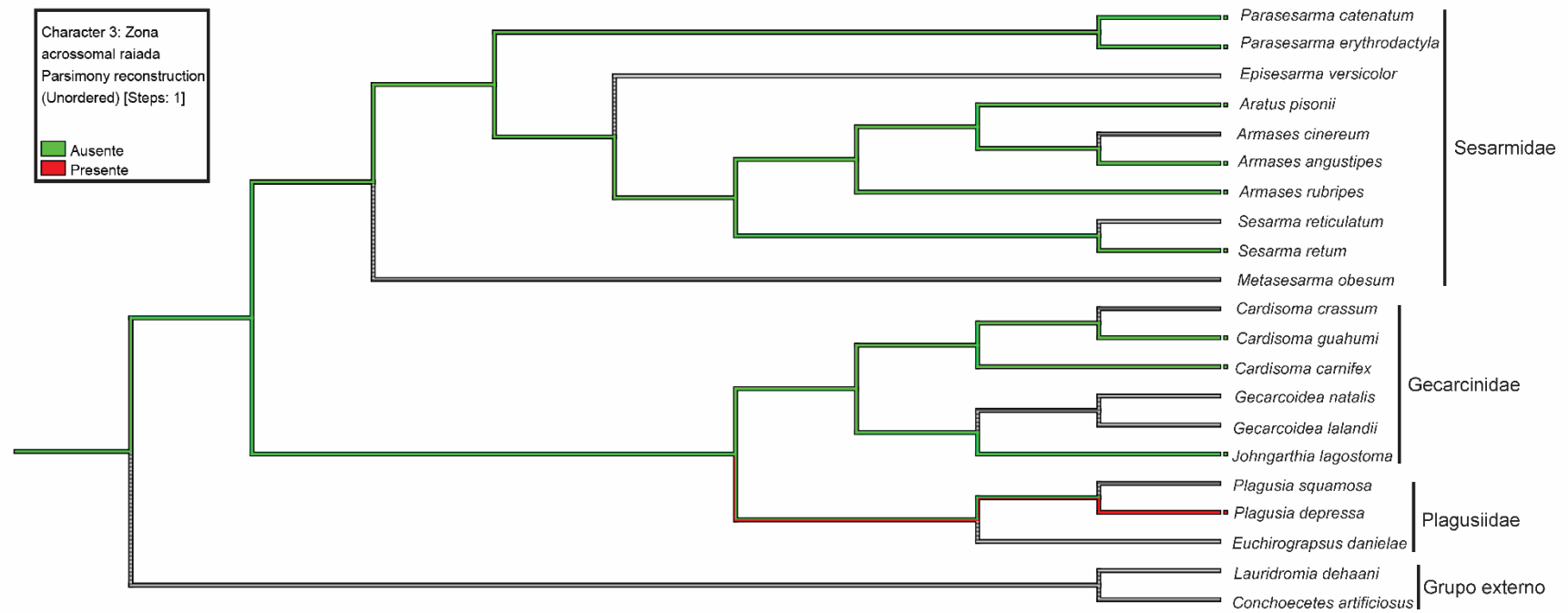


Figura 9. Mapeamento do caráter “Zona acrossomal raiada”. Zona acrossomal raiada presente apenas em *P. depressa*, sendo considerada apomorfia deste único plagusídeo estudado.

Figura 10

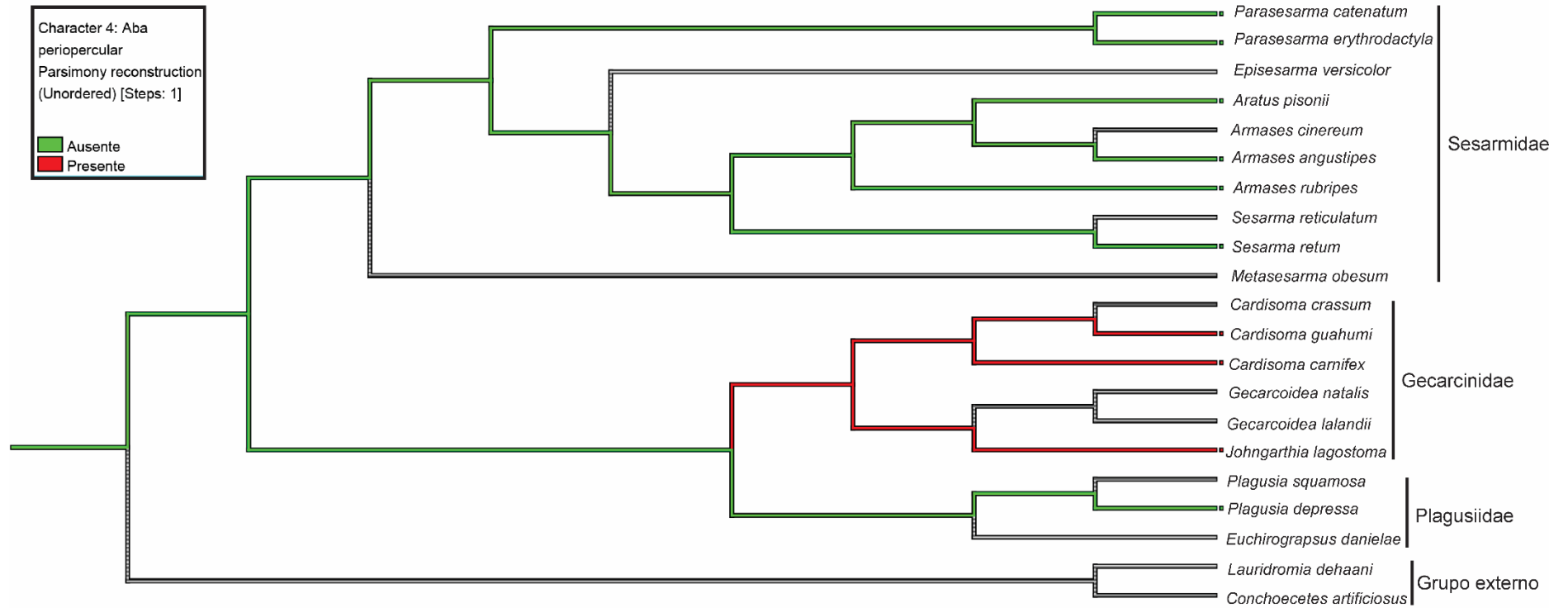


Figura 10. Mapeamento do caráter “Aba periopercular”. A ausência da aba periopercular (verde) é plesiomórfica ao clado formado por Sesarmidae, Gecarcinidae e Plagusiidae. Note que apenas entre os Gecarcinidae analisados, este caráter está presente (vermelho).

Discussão

A monofilia de Thoracotremata, estudada a partir da ultraestrutura do espermatozoide, foi estabelecida com base em três sinapomorfias principais: a perda da zona acrossomal raiada, a presença do botão apical, preenchendo a perfuração opercular central e as lamelas concêntricas presentes na zona acrossomal externa (Jamieson & Tudge, 2000). A análise geral dos espermatozoides dos representantes estudados, incluindo aqueles descritos na literatura científica, corrobora a proposição das sinapomorfias anteriormente citadas, com base nas famílias estudadas, em adição a Gecarcinidae (Jamieson et al., 1996; Benetti et al., 2013; Capítulo III da presente tese). No entanto, além das características mencionadas anteriormente, o anel espessado eletrodenso e uma cápsula acrossomal que se estende até a região anterior do anel espessado, poderiam ser incluídas como sinapomorfias adicionais, embora o presente estudo não tenha incluído todas as outras famílias de Thoracotremata, e estes caracteres não tenham sido abordados nas descrições existentes. Assim, o presente trabalho investigou pela primeira vez, o padrão de ocorrência das sinapomorfias em Sesarmidae e Plagusiidae, além de utilizar informações descritas para Gecarcinidae (Capítulo III), elucidando as relações de parentesco entre as espécies e discutindo como os caracteres espermáticos podem ter evoluído nestas famílias.

Em Thoracotremata, a ultraestrutura dos espermatozoides foi descrita para as famílias Pinnotheridae De Haan, 1833, Ocypodidae Rafinesque, 1815, Varunidae H. Milne Edwards, 1853, Mictyridae Dana, 1815, Grapsidae MacLeay, 1838 e Gecarcinidae (Yasuzumi, 1960; Jamieson, 1991, 1994; Medina, 1992; Jamieson et al., 1996; Jamieson & Tudge, 2000; Becker et al., 2013; Benetti et al., 2008, 2013; Tiseo et al., 2017; Capítulo II). Em Sesarmidae, as informações sobre a ultraestrutura do espermatozoide são limitadas aos estudos realizados por Jamieson (1991, 1994) e Jamieson & Tudge (2000), com as espécies *Parasesarma erythodactylum* (Hess, 1865) como *Sesarma erythodactyla*, e *Parasesarma catenatum* (Ortmann, 1897), como *Sesarma catenata*, indicando que o conhecimento para a família é incipiente, a ponto de evidenciar caracteres exclusivos para a família. Neste trabalho, acrescentamos novas quatro espécies, ampliando a resolução das sinapomorfias em Sesarmidae e, além disso, mostrando pela primeira vez o espermatozoide de Plagusiidae, pela análise da única espécie encontrada no Brasil, *P. depressa*. Assim, estes dados em conjunto com aqueles provenientes do capítulo II, permitem agora organizar, também características comuns para este grupo.

A comparação entre os Sesarmidae, Plagusiidae e Gecarcinidae mostra que o clado compartilha a presença de espermatozoides esféricos ou elípticos, formados por uma vesícula

acrossomal, com diferentes zonas acrossomais concêntricas, opérculo eletrodenso, centralmente perfurado, botão apical, presença do anel espessado eletrodenso e núcleo preenchido por cromatina, sendo estes caracteres demonstrados por meio das figuras publicadas, porém não devidamente descritos (Jamieson, 1994; Jamieson et al., 1996; Jamieson & Tudge, 2000; Benetti et al., 2013; Capítulo II). Essas características ultraestruturais podem ser sinapomorfias compartilhadas entre as famílias, cuja relação monofilética foi confirmada por análises moleculares recentes (Tsang et al. 2014, 2022; Capítulo I).

As principais diferenças observadas entre as espécies das famílias Sesarmidae, Plagusiidae e Gecarcinidae foram: presença da aba periopercular, anel opercular acessório, número de zonas acrossomais, presença da zona acrossomal raiada, morfologia da câmara perforatorial, anel xantídeo modificado e lamelas concêntricas da zona acrossomal externa. A aba periopercular eletrolúcida, que circunda as margens operculares, não foi observada ou descrita para os representantes de Sesarmidae e Plagusiidae, porém, esta estrutura é uma das sinapomorfias de Gecarcinidae, uma vez que ela está presente em *Johngarthia lagostoma* (H. Milne Edwards, 1837), *Cardisoma guanhumi* Latreille in Latreille, Le Peletier, Serville & Guérin, 1828 e *Cardisoma carnifex* (Herbst, 1796) (Jamieson et al., 1996; Benetti et al., 2013; Capítulo III). Jamieson et al. (1996) propuseram que a aba periopercular observada em *C. carnifex* é uma característica homóloga entre os Heterotremata, argumentando que essa estrutura é comum a vários representantes deste grupo revisados por Jamieson (1994). Entre as outras famílias de Thoracotremata, a aba periopercular foi observada em pelo menos um representante de Pinnotheridae e no Grapsidae *Geograpsus lividus* (H. Milne Edwards, 1837) (Becker et al., 2013; Tiseo et al., 2017). Ao analisar o cladograma do presente estudo, juntamente com cladogramas prévios na literatura (Tsang et al., 2014, 2022), pode-se inferir que a aba periopercular parece ser um caráter homoplásico entre os Heterotremata. As lamelas concêntricas observadas ocorrendo na zona externa da vesícula acrossomal, a qual é considerada uma sinapomorfia de Thoracotremata, estão ausentes em Sesarmidae e Plagusiidae, porém é uma característica comum aos representantes de Gecarcinidae (ver Capítulo III para maiores detalhes). Desta maneira, parece que tanto a aba periopercular, como as lamelas concêntricas foram perdidas nas famílias aqui analisadas, representando assim, ser as sinapomorfias dos gecarcinídeos, como proposto no capítulo II desta tese.

No Plagusiidae estudado, a câmara perforatorial tem morfologia do tipo estreitamente panduriforme, com ápice estreito e reto, diferente do padrão encontrado nas outras espécies deste estudo. Em Sesarmidae, a câmara perforatorial é em geral, do tipo obdeltóide, enquanto

em Gecarcinidae esta estrutura é obovoíde. Em Brachyura, a câmara perforatorial pode ter papel importante na penetração do córion do ovócito, durante a fertilização, facilitando sua ruptura (Brown, 1966; Medina, 1992; Medina e Rodriguez, 1992; Hirohashi & Yanagimachi, 2018). Além disso, alguns trabalhos têm demonstrado que durante a espermatogênese do Grapsoidea *Eriocheir sinensis* Milne Edwards, proteínas motoras são gradualmente acumuladas no ápice da câmara perforatorial e no opérculo, desempenhando papéis importantes na formação do acrossomo e na sua eversão para a fertilização do ovócito (Yu et al., 2009; Sun et al., 2010, 2015). Assim, as diferenças morfológicas da câmara perforatorial provavelmente estariam relacionadas a estéreo-complementaridade de cada espécie para a reação acrossomal, durante o processo de fertilização.

Nos Sesarmidae aqui estudados, e nos poucos descritos na literatura, o anel opercular encontra-se ausente e a vesícula acrossomal é formada por apenas três zonas acrossomais (Jamieson, 1991; 1994; Jamieson & Tudge, 2000). Por sua vez, Plagusiidae e Gecarcinidae possuem em comum a presença do anel opercular acessório e a vesícula acrossomal com quatro zonas acrossomais, características presentes no ancestral comum entre estas famílias. Portanto, embora o anel opercular acessório seja relativamente mais curto entre os gecarcinídeos, sua presença, juntamente com o caráter do acrossomo exibindo quatro zonas acrossomais, representa as sinapomorfias de Plagusiidae e Gecarcinidae e, provavelmente presente no ancestral comum destes grupos. A comparação com espécies de Thoracotremata descritas na literatura demonstra que o número de zonas acrossomais varia consideravelmente entre as diferentes famílias, sendo mais frequente a presença de três zonas acrossomais, sinalizando para uma provável homoplasia. No entanto, a presença do anel opercular acessório é um caráter também observado em Pinnotheridae e Grapsidae (Jamieson, 1991, 1994; Jamieson & Tudge, 2000; Becker et al., 2013; Tiseo et al., 2017). Sendo assim, um estudo envolvendo representantes de um maior número de famílias, se faz necessário para elucidar se o anel opercular acessório é um caráter plesiomórfico em Thoracotremata.

A presença da zona acrossomal raiada observada no Plagusiidae *P. depressa* é uma característica exclusiva em comparação com as outras famílias de Thoracotremata aqui estudadas e assim como outras descritas na literatura, podendo ser caracterizada como uma das apomorfias da espécie. Infelizmente, no Brasil existe somente uma espécie e ousamos, dentro do contexto deste trabalho, extrapolar, condicionalmente, a uma característica da família. Esta zona normalmente não é comum aos representantes de Thoracotremata e sua ausência foi até indicada como uma das sinapomorfias do grupo (Jamieson, 1994; Jamieson et al., 1995). Jamieson & Tudge (2000) consideram que, para algumas espécies, por esta

estrutura se tratar de uma zona pouco evidente, é normalmente descrita como ausente. A zona acrossomal raiada é considerada uma característica de caranguejos Heterotremata, embora sua presença e localização sejam relativamente variáveis nas espécies deste grupo (Jamieson, 1994; Jamieson et al., 1995). Essa variação indica que este caráter pode ser uma homoplasia entre Plagusiidae e alguns representantes de Heterotremata. O anel xantídeo modificado é característico para algumas espécies de Thoracotremata (Jamieson, 1994; Jamieson et al., 1996), e está ausente em Sesarmidae e Plagusiidae. Entre os gecarcinídeos, clado-irmão de Plagusiidae, o anel xantídeo modificado está presente e é uma das características compartilhadas pela família (Jamieson et al., 1996; Benetti et al., 2013; Capítulo III da presente tese). A análise dessa estrutura indicou a existência de dois padrões morfológicos: 1) Anel xantídeo modificado ocorrendo desde a base da câmara perforatorial, sendo mais espesso nessa região, e se estendendo em direção ao ápice da vesícula acrossomal, onde se torna mais delgado, sendo típico aos gêneros de *Cardisoma* (Jamieson et al., 1996; Benetti et al., 2013; Capítulo III da presente tese); 2) Anel xantídeo modificado observado em *J. lagostoma*, que é contínuo ao anel espessado, não o recobrimdo, sendo delgado e em forma de meia-lua (Capítulo III da presente tese). Entre os representantes previamente descritos na literatura, o anel xantídeo modificado foi verificado como presente em *Mictyris longicarpus* Latreille, 1806 [Ocypodoidea – Mictyridae] e *Ocypode ceratophthalmus* (Pallas, 1772) como *Ocypode ceratophthalma* [Ocypodoidea – Ocypodidae] (Jamieson, 1994). Apesar de não ter sido descrito, o anel também parece estar presente nos representantes de *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) e grapsídeos da literatura (Matos et al., 2001; Tiseo et al., 2017).

Em conclusão, os Sesarmidae, Plagusiidae e Gecarcinidae compartilham características comuns aos representantes de Thoracotremata, como espermatozoides esféricos ou elípticos, formados por um acrossoma com zonas acrossomais concêntricas, opérculo eletrodenso centralmente perfurado e com botão apical, presença do anel espessado eletrodenso na base da câmara perforatorial sobre a unidade de membrana interna da vesícula acrossomal, cápsula contínua até a altura da margem anterior do anel espessado e núcleo preenchido por cromatina, com a presença dos braços radiais. O espermatozoide de Sesarmidae tem três zonas acrossomais, e não possuem aba periopercular e anel opercular acessório. No Plagusiidae *P. depressa*, a aba periopercular está ausente, e a vesícula acrossomal apresenta quatro camadas concêntricas, sendo a zona acrossomal interna raiada, uma característica exclusiva nesta família. A ausência da zona acrossomal raiada é um caráter utilizado para agrupar os Thoracotremata, assim, em *P. depressa* esta zona parece ser uma homoplasia em relação aos Heterotremata. Adicionalmente, *P. depressa* exibiu anel opercular

acessório trilaminar, longo e curvado e quatro camadas acrossomais, características as quais são encontradas observadas em Gecarcinidae e, portanto, provavelmente ocorreram no ancestral comum destas famílias.

Referências bibliográficas

- 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(11), 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>
- Benetti, A. S., Tavares, M., Carvalho dos Santos, D., & Tudge, C. (2013). Ultrastructure of the spermatophores and spermatozoa from the gecarcinid land crab, *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1828, (Crustacea, Brachyura, Gecarcinidae) from the western Atlantic. *Invertebrate Reproduction & Development*, 57(1), 61-69. <https://doi.org/10.1080/07924259.2012.666506>
- Brown, G. G. (1966). Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm—egg interaction in the decapod *Callinectes sapidus*. *Journal of Ultrastructure Research*, 14(5-6), 425-440. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(66\)80073-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(66)80073-4)
- Clopton, R. E. (2004). Standard Nomenclature and Metrics of Plane Shapes for Use in Gregarine Taxonomy. *Comparative Parasitology*, 71(2), 130-140. <https://doi.org/10.1654/4151>
- 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>
- Guinot, D. (1977). Propositions pour une nouvelle classification des Crustacés, Décapodes, Brachyours. *Comptes Rendus Hebdomaires des Seances de l'Academie des Sciences, Paris, serie D*, 285, 1049-1052.
- 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. 10.11646/ZOOTAXA.3665.1.1

- Hirohashi, N., Yanagimachi, R. (2018). Sperm acrosome reaction: its site and role in fertilization. *Biology of reproduction*. 99(1), 127-33.
- 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 of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 345(1314), 373-393. <https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0116>
- Jamieson, B. G., Guinot, D., & Forges, B. R. (1995). Phylogeny. of the Brachyura (Crustacea, Decapoda): Evidence from Spermatozoal Ultrastructure. *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*, 166, 265-283.
- Jamieson, B. G. M., Guinot, D., & Forges, B. R. (1996). Contrasting spermatozoal ultrastructure in two thoracotreme crabs, *Cardisoma carnifex* (Gecarcinidae) and *Varunu litterata* (Grapsidae) (Crustacea: Brachyura). *Invertebrate Reproduction & Development*, 29(2), 111-126. <https://doi.org/10.1080/07924259.1996.9672503>
- Jamieson, B. G. M., & Tudge, C. C. (2000). Crustacea–Decapoda. In ‘Reproductive Biology of Invertebrates. Volume IX, Part C. Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny’.(Ed. BGM Jamieson.) pp. 1-95.
- Karnovsky, J. M. (1965). A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *J. cell Biol*, 27, 1A-149A.
- Maddison, W. P. and D.R. Maddison. 2021. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.7.
- Matos, E. R., Santos, M. N. S., Corral, L., & Azevedo, C. (2001). Ultra-estrutura do espermatozóide de *Ocypode quadrata* Fabricius, 1787 (Crustacea, Ocypodidae) do litoral norte do Brasil. *Revista de Ciências Agrárias-Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 36, 131-135.
- Medina, A. (1992). Structural modifications of sperm from the fiddler crab *Uca tangeri* (Decapoda) during early stages of fertilization. *Journal of crustacean Biology*, 12(4), 610-614. <https://doi.org/10.1163/193724092X00085>
- Medina, A., & Rodríguez, A. (1992). Spermiogenesis and sperm structure in the crab *Uca tangeri* (Crustacea, Brachyura), with special reference to the acrosome differentiation. *Zoomorphology*, 111(3), 161-165. <https://doi.org/10.1007/BF01632905>

- Montanaro, J., Gruber, D., & Leisch, N. (2016). Improved ultrastructure of marine invertebrates using non-toxic buffers. *PeerJ*, 4, e1860.
- Schubart, C. D. (2000). Use of mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies in Crustacea. *The biodiversity crisis and Crustacea*.
- Schubart, C. D., Cuesta, J. A., & Felder, D. L. (2002). Glyptograpsidae, a new brachyuran family from Central America: larval and adult morphology, and a molecular phylogeny of the Grapsoidea. *Journal of Crustacean Biology*, 22(1), 28-44. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990206>
- Sun, X., He, Y., Hou, L., & Yang, W. X. (2010). Myosin Va Participates in Acrosomal Formation and Nuclear Morphogenesis during Spermatogenesis of Chinese Mitten Crab *Eriocheir sinensis* s. *PLoS One*, 5(9), e12738. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012738>
- Sun, W. J., Zhu, M., Wang, Y. L., Li, Q., Yang, H. D., Duan, Z. L., He, L., & Wang, Q. (2015). ERK is involved in the process of acrosome reaction in vitro of the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Marine Biotechnology*, 17, 305-316. <https://doi.org/10.1007/s10126-015-9619-y>
- 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*, 269, 166-176. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2017.07.002>
- Tsang, L. M., Schubart, C. D., Ahyong, S. T., Lai, J. C. Y., Au, E. Y. C., Chan, T.-Y., Ng, P. K. L., & 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>
- Wolfe, J. M., Ballou, L., Luque, R., Watson-Zink, V. M., Ahyong, S. T., Barido-Sottani, J., Chan, T. Y., Chu, K. H., Crandall, K. A., Daniels, S. R., Felder, D. L., Mancke, H., Martin, J. W., Ng, P. K. L., Ortega-Hernández, J., Palacios Theil, E. N., Pentcheff, D., Robles, R., Thoma, B. P., Tsang, L. M., Wetzter, R., Windsor, A. M.,

- & Bracken-Grissom, H. D. (2022). Convergent adaptation of true crabs (Decapoda: Brachyura) to a gradient of terrestrial environments. *BioRxiv*, 2022–12.
- Wolfe, J. M., Breinholt, J. W., Crandall, K. A., Lemmon, A. R., Lemmon, E. M., Timm, L. E., Siddall, M. 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. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0079>
- Yasuzumi, G. (1960). Spermatogenesis in Animals as Revealed by Electron Microscopy. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 7(1), 73-78. <https://doi.org/10.1083/jcb.7.1.73>
- Yu, K., Hou, L., Zhu, J. Q., Ying, X. P., & Yang, W. X. (2009). KIFC1 participates in acrosomal biogenesis, with discussion of its importance for the perforatorium in the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Cell and tissue research*, 337(1), 113-123. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0800-3>

Capítulo V

Espermiotaxonomia e filogenia molecular: análise integrativa para o estudo dos caracteres espermáticos em Varunidae e Grapsidae (Brachyura: Thoracotremata)

Resumo

A ultraestrutura dos espermatozoides tem sido uma ferramenta útil para entender as relações de parentesco entre diferentes grupos de animais e entender a evolução de suas características espermáticas. Neste capítulo, descrevemos a ultraestrutura dos espermatozoides de caranguejos Varunidae e Grapsidae, com o objetivo de identificar características robustas para caracterizar as famílias e espécies e, ao mesmo tempo entender como os caracteres evoluíram nestas famílias filogeneticamente relacionadas. O vaso deferente médio de cada espécie foi fixado e submetido ao protocolo de rotina para microscopia eletrônica de transmissão em resina Epon-Araldite. Todas as espécies apresentaram espermatozoides com uma vesícula acrossomal constituída por três zonas acrossomais concêntricas, polo apical ou anterior com opérculo eletrodenso e o núcleo, no polo basal ou posterior, portando braços radiais. Ao comparar a ultraestrutura entre as diferentes famílias, Varunidae compartilha opérculo não perfurado, com delgada camada eletrodensa, onde deveria ocorrer a perfuração, a ausência do botão apical, da aba periopercular e do anel opercular acessório, além da cápsula contínua com o opérculo, estendendo-se até a metade da altura basal da câmara perforatorial, ultrapassando o anel espessado. Por sua vez, Grapsidae apresenta opérculo perfurado, botão apical, aba periopercular e anel opercular acessório. A principal característica dos espermatozoides dos grapsídeos é a ausência do anel espessado eletrodenso, proposto na literatura. Contudo, este parece estar presente como estrutura menos eletrodensa, distinto dos outros Thoracotremata. O anel xantídeo modificado está presente em Grapsidae e pode ser uma plesiomorfia de Thoracotremata. A ultraestrutura dos espermatozoides em Varunidae e Grapsidae dividem caracteres com os poucos Macrophthalmidae e Mictyridae da literatura e espelham as filogenias moleculares, indicando ser uma ferramenta robusta para compreender as relações de parentesco em Brachyura.

Palavras-chave: Brachyura, espermiotaxonomia, microscopia eletrônica.

Introdução

Em Thoracotremata Guinot, 1977, a superfamília Grapsoidea MacLeay, 1838 mostra uma ampla diversidade de espécies de caranguejos decápodes, os quais podem ser encontrados em diversos habitats, preferencialmente estuarinos e marinhos, além de representantes semi-terrestres. De acordo com análises morfológicas, incluído a ultraestrutura do espermatozoide (Guinot, 1977; Jamieson, 1991; Jamieson et al., 1995; Jamieson & Tudge, 2000), Grapsoidea foi considerada um agrupamento monofilético, com as seguintes famílias: Gecarcinidae MacLeay, 1838, Glyptograpsidae Schubart, Cuesta & Felder, 2002, Grapsidae MacLeay, 1838, Leptograpsodidae Guinot, Ng & Rodriguez Moreno, 2018, Plagusiidae Dana, 1851, Sesarmidae Dana, 1851, Varunidae H. Milne Edwards, 1853, Xenograpsidae Ng, Davie, Schubart & Ng, 2007 e Percnidae Stevcic, 2005 (Ng et al., 2008; Davie et al., 2015). Entretanto, devido a posição filogenética de algumas de suas famílias, estudos moleculares recentes demonstraram a não monofilia de Grapsoidea (Kitaura et al., 2002; Schubart et al., 2006; Tsang et al., 2014), incluído o “preprint” de Wolfe et al. (2022).

Estudos morfológicos utilizando a ultraestrutura dos espermatozoides em decápodes têm se tornado uma ferramenta amplamente utilizada em abordagens filogenéticas e taxonômicas para resolver questões relacionadas à distribuição taxonômica e relações de parentesco entre espécies (Jamieson & Tudge, 2000; Tudge, 2009; Camargo et al., 2016, 2017; Assugeni et al., 2017; Garcia Bento et al., 2018). Em Varunidae, quatro espécies tiveram a ultraestrutura dos espermatozoides descritas: *Eriocheir japonica* (De Haan, 1835) como *Eriocheir japonicus* Yasuzumi (1960), *Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards, 1853 Zeng et al. (2019), *Varuna litterata* (Fabricius, 1798) em Jamieson et al. (1996) e *Cyclograpsus punctatus* Milne Edwards, 1837 Jamieson & Tudge (2000). Por sua vez, em Grapsidae, cinco espécies tiveram os espermatozoides descritos sob o ponto de vista da microscopia eletrônica de transmissão, a saber: *Grapsus albolineatus* Latreille in Milbert, 1812 Jamieson (1991), *Metopograpsus messor* (Forsk., 1775) em Anilkumar et al. (1999), *Pachygrapsus transversus* (Gibbes, 1850), *Pachygrapsus gracilis* (de Saussure, 1857) e *Geograpsus lividus* (H. Milne Edwards, 1837) em Tiseo et al. (2017). Porém, nenhum dos estudos realizados até o momento integraram caracteres espermáticos das duas famílias a análises moleculares, a fim de elucidar como as características espermáticas poderiam ter sido originadas e como ou se estas modificaram-se nestes grupos.

Os espermatozoides em caranguejos têm grande variedade morfológica de caracteres, mesmo sendo células imóveis e aflageladas. Em geral, estas células germinativas são compostas por uma vesícula acrossomal, constituída por diferentes camadas ou zonas acrossomais, a qual é centralmente invaginada pelo citoplasma subacrossomal, formando a câmara perforatorial, justaposta ao opérculo e região subopercular. Assim, será aqui utilizado o polo onde encontra-se o opérculo como polo ou região anterior/apical do espermatozoide, sendo o polo posterior (basal) considerado aquele em que se encontra o núcleo. De acordo com a literatura, os Thoracotremata compartilham os seguintes caracteres: zonação concêntrica da vesícula acrossomal, ausência da zona acrossomal raiada, presença do botão apical sobre a perfuração do opérculo e anel opercular acessório (Jamieson & Tudge, 2000).

Neste capítulo foi realizada a descrição da ultraestrutura dos espermatozoides de espécies brasileiras de Varunidae [*Cyclograpsus integer* H. Milne Edwards, 1837, *Cyrtograpsus angulatus* Dana, 1851 e *Neohelice granulata* (Dana, 1851)] e Grapsidae [*Grapsus grapsus* (Linnaeus, 1758), *Ge. lividus*, *Goniopsis cruentata* (Latreille, 1803), *Pachygrapsus transversus* e *P. gracilis*], buscando identificar características espermáticas robustas para separar as espécies em suas respectivas famílias. Além da descrição morfológica dos espermatozoides, combinamos esses dados com informações filogenéticas moleculares (capítulo I), para identificar características espermáticas que fossem apomorfias nestes caranguejos Thoracotremata.

Material e Métodos

Machos maduros de cada espécie foram coletados manualmente em áreas intertidais de costão rochoso, praias rochosas, manguezais e margens de riachos em áreas de restinga, entre 2013 a 2022, na costa sudeste e sul do Atlântico Sul, Brasil.

Os animais coletados (n=5 de cada espécie) foram dissecados e amostras da região média do vaso deferente (1mm³) foram fixados em marPHEM (PHEM 1.5X + glutaraldeído 2.5% + sacarose) em água destilada e solução Karnovsky (paraformaldeído 2% + glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1M, (pH = 7.4) com sacarose 5%, por quatro horas (Ro et al., 1990; Montanaro et al., 2016). Após três banhos em tampão específico para cada fixador, as amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1%, tamponado por duas horas. Os materiais foram contrastados “Em Bloc” “overnight” com acetato de uranila 1%. A desidratação das peças foi realizada em série progressiva de acetona (50 a 95%) e as amostras foram embebidas, incluídas e

polimerizadas com resina Epon - Araldite. Os cortes ultrafinos (50nm) foram realizados e obtidos com uso do ultramicrotomo Leica UC7. As grades de cobre (100 mesh) contendo os cortes foram contrastadas com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo 0,5%. Os cortes foram analisados no microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM – 1010, com feixe de eletrônico acelerado a 80KV, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV, UNESP – Campus de Jaboticabal.

A relação do comprimento pela largura (C/L) da vesícula acrossomal foi calculada com base em medidas tomadas pela maior extensão entre o botão apical, no polo anterior e a região basal do acrossoma, no polo posterior (próximo ao núcleo), onde inicia-se a câmara perforatorial. A largura foi obtida na área de maior extensão lateral da vesícula acrossomal. Os espermatozoides tiveram suas características reconhecidas e nominadas segundo Jamieson (1994) e Jamieson & Tudge (2000). Para a morfologia da câmara perforatorial seguiu-se Clopton (2004).

Análise filogenética e reconstrução ancestral de caráter

A hipótese filogenética considerada neste trabalho foi proposta no Capítulo I. Um diagrama representativo dos dados moleculares obtidos (cladograma) pela autora foi elaborado por Máxima Verossimilhança (ML – Maximum Likelihood). Apenas as sequências dos representantes de Varunidae, Macrophthalmidae Dana, 1851, Mictyridae Dana, 1851, Xenograpsidae, Leptograpsidae e Grapsidae foram mantidas para a obtenção do cladograma. O suporte dos ramos foi demonstrado pelo método de bootstrap ultrarrápido com 1000 réplicas. Para a reconstrução ancestral do caráter, foi produzida uma matriz de dados espermáticos ultraestruturais, levando em consideração caracteres robustos para separar as famílias analisadas neste capítulo. Para designar o estado do caractere, foram atribuídos números, como segue: Caráter 1 “Opérculo”: Imperfurado (0), Perfurado (1). Caráter 2 “Botão apical”: Ausente (0), Presente (1). Caráter 3 “Anel opercular acessório e aba periopercular”: Ausente (0), Presente (1). Caráter 4 “Cápsula do acrossomo”: Até o anel espessado (0), Até a metade da câmara perforatorial (1). Caráter 5 “Anel espessado eletrodenso”: Ausente (0); Presente (1). Nas espécies com dados insuficientes, o status atribuído foi o símbolo “?”. A matriz, juntamente com a árvore gerada por máxima verossimilhança, foi carregada no software Mesquite v.3.7 (Maddison e Maddison, 2021) para a reconstrução da história do caráter pelo critério de parcimônia.

Resultados

Morfologia geral dos espermatozoides

De maneira geral, *C. integer*, *Cyr. angulatus*, *N. granulata*, *G. grapsus*, *P. transversus*, *P. gracilis*, *Ge. lividus* e *Go. cruentata* exibem espermatozoides com morfologia típica observada em Thoracotremata. A vesícula acrossomal é esférica ou elíptica, constituída por diferentes camadas ou zonas concêntricas, a qual está envolta quase que completamente pela região nuclear, formando uma taça. O opérculo eletrodenso, está no polo apical ou anterior e o núcleo, está no polo basal ou posterior, o qual possui braços radiais delgados. A cápsula recobre o opérculo saliente e adentra o espermatozoide na margem do opérculo. Esta região eletrolúcida é formada por uma unidade de membrana, que é a membrana da vesícula acrossomal, que na invaginação do citoplasma subacrossomal é contínua com a unidade de membrana da câmara perforatorial. Assim, a unidade de membrana da cápsula e da vesícula acrossomal são sinônimas e contínuas com a câmara perforatorial (Esquema 1).

Família Varunidae

Cyclograpsus integer

Em corte longitudinal, os espermatozoides de *C. integer* possuem forma elíptica, com razão acrossomal $1,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$ e núcleo em forma de taça, com cromatina fibrilar e vários braços radiais (Fig. 1A). O opérculo tem periferia espessa lembrando uma estrutura perfurada, inclusive pela presença do ápice saliente da câmara perforatorial (Fig. 1A). Contudo, em maiores aumentos, nota-se uma delgada camada eletrodensa recobrimdo o ápice da câmara perforatorial, ligando as duas áreas periféricas espessas do opérculo, o que caracteriza um opérculo modificado e não perfurado (Fig. 1B). O espaço eletrolúcido que compõe a cápsula inicia-se neste ponto do delgado opérculo e progride até a altura da metade da câmara perforatorial, ultrapassando o anel espessado (Fig. 1A e C). O botão apical está ausente e abaixo do opérculo nota-se a região subopercular, muito delgada e menos eletrodensa que o opérculo e sem anel opercular acessório (Fig. 1B). Nas margens do opérculo não é encontrado a aba (“rim”) periopercular (Fig. 1A-C). A câmara perforatorial é estreitamente deltóide, com microtúbulos dispostos paralelamente ao maior eixo e seu ápice é arredondado, e se projeta para além da região perfurada do

opérculo, ultrapassando a altura das margens da vesícula acrossomal. O acrossomo apresenta três camadas concêntricas: interna, externa e periférica (Fig. 1A - C). A câmara perforatorial encontra-se envolvida pela zona interna, a qual é ligeiramente dilatada apicalmente, tornando-se arredondada no terço superior. A zona externa do acrossomo é homogênea, menos eletrodensa do que a interna, sem lamelas concêntricas, sendo a zona acrossomal periférica delgada menos eletrodensa que as demais zonas acrossomais e com uma linha eletrodensa em contato com o material eletrolucido da cápsula (Fig. 1C). Contudo, uma outra zona espessa e arredondada, justaposta ao opérculo, imersa exclusivamente na zona externa, é característica desta espécie (Fig. 1A e C). Na base da câmara perforatorial, observa-se o anel espessado floculado, em contato com o material eletrolúcido da cápsula e que tem contato direto com a zona externa da vesícula acrossomal (Fig. 1D). Em cortes transversais no terço superior da vesícula acrossomal, pode-se perceber a ampla zona acrossomal interna mais eletrodensa do que a externa, a qual também é bastante ampla (Fig. 1E). Na base da câmara perforatorial, nota-se a morfologia estrelada desta estrutura, sendo envolvida pelo anel espessado floculado (Fig. 1F).

Neohelice granulata

Os espermatozoides de *N. granulata* são elípticos, com razão acrossomal de $1,1 \pm 0,1 \mu\text{m}$. A região nuclear é preenchida por cromatina fibrosa e mostra a presença dos braços radiais (Fig. 2A). No ápice da vesícula acrossomal, observa-se o opérculo não perfurado, o qual é eletrodenso, espesso nas margens e centralmente recoberto por uma delgada câmara eletrodensa, exatamente no ponto onde está o ápice da câmara perforatorial, levando a falsa impressão de perfuração (Fig. 2A e B). A superfície do opérculo é quase plana, tem forma de arco delgado no ápice da câmara perforatorial, a qual fica disposta abaixo da maior parte da região delgada opercular. Justaposta ao opérculo nota-se a região subopercular, a qual é granular e menos eletrodensa (Fig. 2B). O botão apical, o anel periopercular acessório e a aba periopercular estão ausentes (Fig. 2A e B). A cápsula ao redor da vesícula acrossomal progride com seu material eletrolúcido da porção distal do opérculo até metade da altura da câmara perforatorial, ultrapassando em muito o anel espessado da cápsula, na base da câmara perforatorial (Fig. 2C). A câmara é profundamente deltóide, com ápice amplo e mais plano que arredondado, preenchida com túbulos perforatoriais, dispostos paralelamente ao maior eixo da câmara (Fig. 2A - D). A zona mais interna da vesícula acrossomal tem contato direto e exclusivo

com a região subopercular e mostra-se arredondada, não chegando à base da câmara perforatorial. A zona acrossomal externa é ligeiramente menos eletrodensa do que a interna e mostra a presença de lamelas concêntricas próximas a zona periférica, muito delgada e quase restrita a uma linha eletrodensa no limite com a cápsula (Fig. 2A e C). A base da câmara perforatorial é espessa e envolta pelo anel espessado eletrodense em contato com a cápsula (Fig. 2D). Nos cortes transversais no terço superior da vesícula acrossomal nota-se as lamelas concêntricas e as zonas acrossomais (Fig. 2E e F) e, próximo à base, o anel espessado é floculado, envolto apenas pela zona acrossomal externa (Fig. 2G).

Cyrtograpsus angulatus

O espermatozoide de *Cyr. angulatus* mostra um acrossomo esférico com razão acrossomal de $1,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$, núcleo com cromatina fibrosa e braços radiais, no polo basal ou posterior. O opérculo é espesso perifericamente e o ápice da câmara perforatorial faz com que esta estrutura forme um domo saliente (Fig. 3A). Contudo, nota-se nos maiores aumentos que existe uma delegada camada eletrodensa ligando as duas áreas espessas do opérculo, tornando a estrutura não perfurada (Fig. 3B e C). A região subopercular é menos eletrodensa que o opérculo e mantém a forma de arco ao redor do ápice da câmara perforatorial, e em contato com a zona acrossomal interna (Fig. 3A - C). O botão apical, a aba periopercular e o anel opercular acessório não foram observados no complexo apical. A cápsula acrossomal que recobre o opérculo, inicia-se no interior do espermatozoide, junto a margem opercular, ultrapassando o anel espessado e terminando na altura média da câmara perforatorial (Fig. 3C). A câmara perforatorial é tipo estreitamente deltóide, com túbulos perforatoriais dispostos paralelamente ao maior eixo. Contudo, nesta morfologia tipo deltóide, a câmara perforatorial é mais volumosa e o estrangulamento apical é muito discreto antes da dilatação que forma o ápice claramente arredondado (Fig. 3A e B). O acrossomo é formado por três diferentes zonas, a acrossomal interna, a externa e a periférica. A zona interna é larga no ápice e estreita no terço médio para o posterior da câmara perforatorial. A zona acrossomal externa é a mais ampla de todas as zonas acrossomais e menos eletrodensa do que a zona acrossomal interna. A zona acrossomal periférica é delgada e menos eletrodensa que todas, apresentando uma linha no contato com o material eletrolúcido da cápsula (Fig. 3C - E). A ampla base da câmara perforatorial mostra a presença do anel espessado floculado, associado ao material eletrolúcido da cápsula e, ao mesmo tempo, tem contato direto com

a zona acrossomal externa (Fig. 3D). O acrossomo, quando em corte transversal no terço superior, mostra a ampla camada interna, a qual torna-se bastante reduzida em seções transversais próximo a base da câmara perforatorial (Fig. 3E e F).

Família Grapsidae

Grapsus grapsus

O espermatozoide de *G. grapsus* mostra amplo núcleo com cromatina de aspecto fibrilar e vários braços laterais. A vesícula acrossomal é quase esférica, com razão acrossomal de $1,1 \pm 0,07$. A câmara perforatorial tem forma panduriforme, com morfologia estreita e ápice arredondado (Fig. 4A). O opérculo, que define o polo anterior ou apical do espermatozoide, é centralmente perfurado, eletrodenso e saliente. Na região da perfuração opercular, observa-se a presença do botão apical eletrodenso, esférico e sobre ele, a unidade de membrana da cápsula (Fig. 4B e C). As margens do opérculo têm desenho discretamente ondulado, uma vez que recobre completamente a aba periopercular, com material eletrolúcido da cápsula adjacente ao opérculo nesta altura (Fig. 4B e D). Assim, a aba periopercular na verdade é uma aba subopercular, mas para evitar nomes adicionais desnecessários, será aqui tratado como aba periopercular, como tradicionalmente empregado na literatura especializada. A partir da aba periopercular, estende-se a cápsula acrossomal, na parte interna do espermatozoide (Fig. 4A - D). Abaixo do opérculo está a região subopercular com material menos eletrodenso que o opérculo e na sua margem lateral, encontra-se o anel opercular acessório, trilaminar, levemente curvo, alcançando lateralmente a cápsula na área da aba (Fig. 4B e C). A vesícula acrossomal apresenta três zonas concêntricas, sendo elas a interna, a externa e a periférica, delgada e menos eletrodensa do que as demais zonas, com linhas eletrodensas próximas do material eletrolúcido da cápsula (Fig. 4D e E). A zona acrossomal interna é homogênea e separada totalmente da externa, a qual apresenta muitas lamelas concêntricas, pela presença do anel xantídeo modificado. Este anel modificado ocorre a partir da região anterior da base da câmara perforatorial, sendo homogêneo, mais eletrodenso do que as demais zonas acrossomais e tem forma semelhante à uma meia lua, deslocando-se em direção apical, porém, termina na altura de um terço o ápice da câmara perforatorial, ainda, pode-se notar a delimitação da camada acrossômica externa com pequenos filamentos, em seu ápice quase se interconectando ao anel opercular acessório

(Fig. 4C e D). Uma região menos eletrodensa, com aspecto semelhante ao anel espessado está associado anteriormente a base do anel xantídeo modificado. Este material de eletrodensidade diferenciada está associado à cápsula e parece ser um anel espessado com composição química menos eletrodensa. Entre a unidade de membrana da base da câmara perforatorial e a unidade de membrana da vesícula acrossomal, onde a região menos eletrodensa está ancorada, encontra-se uma área eletrolúcida, a cápsula acrossomal, que termina exatamente na margem anterior desta região menos eletrodensa (Fig. 4E). Em corte transversal próximo à região central da vesícula acrossomal, nota-se a presença da câmara perforatorial, ausência da cápsula, e as zonas acrossomais, sendo a interna separada da externa pelo anel xantídeo modificado e a periférica, onde pode-se observar as lamelas concêntricas nesta última zona (Fig. 4F). Em seção transversal na base da câmara perforatorial, nota-se a delgada camada eletrolúcida da cápsula, a zona acrossomal externa é a região menos eletrodensa. Nesta altura, verifica-se a grande zona externa associada a zona periférica, menos eletrodensa que as demais camadas acrossomais (Fig. 4G).

Pachygrapsus transversus

Os espermatozoides de *P. transversus* tem vesícula acrossomal com razão acrossomal de $1,2 \pm 0,1$, e região nuclear que envolve quase toda a vesícula acrossomal, a qual é preenchida por cromatina fibrosa, com a presença dos braços radiais. Na região central da vesícula acrossomal observa-se a câmara perforatorial com morfologia do tipo piriforme (Fig. 5A). O opérculo é eletrodenso, e centralmente perfurado, sendo que na região da perfuração nota-se a presença do botão apical (Fig. 5B). Abaixo da região opercular está a região subopercular, que é delgada e ligeiramente menos eletrodensa que o opérculo, e nota-se também o anel opercular acessório trilaminar. Na margem opercular, observa-se a estrutura da aba periopercular (Fig. 5A, B). O acrossomo exibe três zonas acrossomais concêntricas, sendo a interna moderadamente eletrodensa, reta e inclinada em direção ao polo opercular. A zona acrossomal externa é eletrodensa, constituída por lamelas concêntricas e a periférica é menos eletrodensa, com linhas concêntricas em contato com o delgado material eletrolúcido da cápsula (Fig. 5C). Margeando externamente a zona acrossomal interna, nota-se a presença do anel xantídeo modificado, que é mais eletrodenso que todas as zonas acrossomais e com morfologia semelhante à uma meia lua, sendo espesso e curto na direção anterior. Uma região menos eletrodensa que a zona acrossomal periférica é observada apoiada apicalmente na zona acrossomal

externa, como se formasse um anel (Fig. 5B e C). Na altura da base da câmara perforatorial ocorre o material menos eletrodense associado ao material eletrolúcido da cápsula, a qual termina na margem anterior deste material (Fig. 5C, D). Em corte transversal próximo ao ápice da câmara perforatorial, observa-se a zona acrossomal interna, o anel xantídeo modificado, a zona acrossomal externa e a periférica (Fig. 5E). Quando em secção próxima à base da câmara perforatorial, nota-se a região menos eletrodensa que envolve a base, além da presença da zona acrossomal externa e a periférica (Fig. 5F).

Pachygrapsus gracilis

O espermatozoide de *P. gracilis* mostra núcleo grande com cromatina de aspecto fibrilar e vários braços radiais. A vesícula acrossomal apresenta razão de $1,1 \pm 0,1$, sendo mais larga do que longa. A câmara perforatorial é do tipo piriforme com morfologia estreita (Fig. 6A). O opérculo eletrodense é perfurado, estriado, plano e arredondado centralmente. Na região perfurada, observa-se o botão apical contínuo à região subopercular, e nas margens operculares está a aba periopercular, contínua com a dilatação da cápsula eletrolúcida (Fig. 6A e B). Abaixo do opérculo, a região subopercular é delgada, granular e menos eletrodensa, e na sua margem está o anel opercular acessório reduzido, levemente curvo e em contato com a aba periopercular e a zona acrossomal periférica (Fig. 6B). O acrossomo é formado por três zonas concêntricas, sendo a zona acrossomal interna eletrodensa e deslocada para a porção anterior do espermatozoide. A zona acrossomal externa possui eletrodensidade similar à zona acrossomal interna, porém, é formada por lamelas concêntricas, principalmente em sua periferia. A zona acrossomal periférica tem uma linha eletrodensa em contato com a o material eletrolúcido da cápsula. O restante da delgada zona periférica é menos eletrodensa que as outras zonas acrossomais (Fig. 6C e D). As zonas acrossomais interna e externa não estão totalmente em contato uma com a outra, devido à presença do anel xantídeo modificado eletrodense, lembrando a letra “C” ou meia lua. A região menos eletrodensa semelhante ao anel espessado, junto a cápsula na altura da câmara perforatorial, está em contato com a zona acrossomal externa, e na sua margem superior inicia-se o anel xantídeo modificado (Fig. 6D). A zona acrossomal interna, o anel xantídeo modificado, a zona acrossomal externa e a periférica são claramente observáveis em cortes transversais. Nesta seção é possível observar braços radiais e mitocôndria degeneradas (Fig. 6E). Próximo à base da câmara

perforatorial, observa-se a delgada camada menos eletrodensa que envolve internamente esta região (Fig. 6F).

Geograpsus lividus

Em corte longitudinal, os espermatozoides de *Ge. lividus* são formados por vesícula acrossomal esférica, finamente mais larga do que longa (razão acrossomal de $1,2 \pm 0,03$). O núcleo é preenchido por cromatina fibrilar e exibe os braços laterais (Fig. 7A). A câmara perforatorial é do tipo profundamente deltóide, com ápice cônico. O opérculo é perfurado, com as margens acentuadamente curvadas produzindo a forma semelhante a um “W”, sendo o seu centro saliente e arredondado, onde estão o ápice da câmara perforatorial e o centro do opérculo com o botão apical sobre o local da perfuração (Fig. 7A e B). Na margem do opérculo observa-se a aba periopercular, cuja área eletrolúcida adjacente, faz parte da cápsula (Fig. 7A - C). Abaixo do opérculo nota-se a região subopercular, a qual é estreita e sinuosa em ambas as faces sob o opérculo, porém acompanha a câmara perforatorial até próximo da base. Essa região subopercular é mais eletrodensa que a camada acrossomal interna e recobre todo o primeiro terço da região apical da câmara perforatorial (Fig. 7 A e C). Na margem anterior lateral da camada subopercular está o anel opercular acessório longo, ligeiramente curvado, formado por linhas de diferentes eletrodensidades (Fig. 7D e E). A vesícula acrossomal é formada por três zonas concêntricas, sendo a mais interna estreita e posicionada anteriormente, menos eletrodensa que o material subopercular, junto da câmara perforatorial (Fig. 7C). A zona acrossomal interna tem contato com a zona acrossomal externa, porém, na sua parte basal, ocorre uma separação destas zonas devido a presença do anel xantídeo modificado. Este anel é eletrodenso, com base larga e ápice delgado, apresentando um formato de meia lua (Fig. 7A -D). A zona acrossomal externa é ampla, preenchida com lamelas concêntricas. A zona acrossomal periférica é menos eletrodensa e possui uma linha em contato com o material eletrolúcido da cápsula (Fig. 7A - D a F). Na base da câmara perforatorial, a cápsula apresenta um material menos eletrodenso, na altura onde deveria ocorrer o anel espessado. A cápsula termina na margem anterior deste material menos eletrodenso, ponto em que se continua o anel xantídeo modificado (Fig. 7D). Em corte transversal próximo do equador da vesícula acrossomal, nota-se a camada interna pequena sobre a região subopercular eletrodensa e circundante à vesícula acrossomal e o espesso anel xantídeo modificado. Em corte transversal na região intermediária do acrossomo, observa-se a zona acrossomal externa preenchida com lamelas concêntricas, enquanto

que a periférica é delgada e menos eletrodensa. (Fig. 7E). Já próximo à base da câmara perforatorial, nota-se a região menos eletrodensa que a zona acrossomal externa, envolvendo internamente a cápsula acrossomal (Fig. 7F).

Goniopsis cruentata

Em *Go. cruentata*, a vesícula acrossomal possui forma esférica, com razão acrossomal $1,0 \pm 0,1$, e núcleo no polo basal marcado pelos braços radiais (Fig. 8A). A câmara perforatorial é do tipo piriforme, com ápice plano levemente arredondado (Fig. 8A e B). O opérculo é perfurado centralmente com botão apical arredondado. Abaixo da região central do opérculo está a estreita camada subopercular, e abaixo de suas margens laterais, observa-se a aba periopercular. O anel opercular acessório eletrodense e curto tem contato estreito com a área dilatada eletrodensa da cápsula na aba periopercular (Fig. 8B). A vesícula acrossomal é formada por três zonas, a interna, a externa e a periférica. A interna é eletrodensa e faz limite com a câmara perforatorial. Por sua vez, a externa é a maior das zonas, com a presença de lamelas concêntricas. A zona acrossomal periférica de aspecto granuloso é ligeiramente menos eletrodensa que a externa e delimitada com linha eletrodensa em contato com a cápsula eletrolúcida (Fig. 8C e D). O anel xantídeo modificado é delgado e recobre o terço basal da câmara perforatorial, não separando completamente a zona interna e a externa (Fig. 8C). A base da câmara perforatorial é marcada por uma região menos eletrodensa que as camadas acrossomais, em contato com o delgado material eletrolúcido da cápsula acrossomal (Fig. 8D). Em corte transversal próximo da região média da vesícula acrossomal, nota-se a zona acrossomal interna, o anel xantídeo modificado e as zonas acrossomais externa e a periférica. As lamelas concêntricas marcam a zona acrossomal externa (Fig. 8E). O corte transversal próximo à base da câmara perforatorial exibe a presença da delgada cápsula acrossomal e as zonas acrossomais externa e periférica (Fig. 8F).

Análise filogenética e reconstrução ancestral de caráter

A árvore editada de acordo com a proposta filogenética do capítulo I indica que as famílias Varunidae, Macrophthalmidae, Mictyridae, Xenograpsidae, Leptograpsidae e Grapsidae compartilham um ancestral comum e formam dois clados: um composto por Varunidae, Macrophthalmidae, Mictyridae, Xenograpsidae e Leptograpsidae, sendo grupo irmão do segundo, que agrupa os táxons de Grapsidae (Fig. 9).

A reconstrução da história ancestral indica que o caráter plesiomórfico do clado analisado é apresentar opérculo perfurado e possuir botão apical (Fig. 10 e 11). As

sinapomorfias de Varunidae são: opérculo imperfurado, ausência do botão apical, anel opercular acessório, aba periopercular, presença da cápsula acrossomal que se estende até a metade da câmara perforatorial e um anel espessado eletrodenso. O clado formado por Grapsidae compartilha como caracteres: presença da aba periopercular, anel opercular acessório e a ausência do anel espessado eletrodenso (Fig. 10 -14).

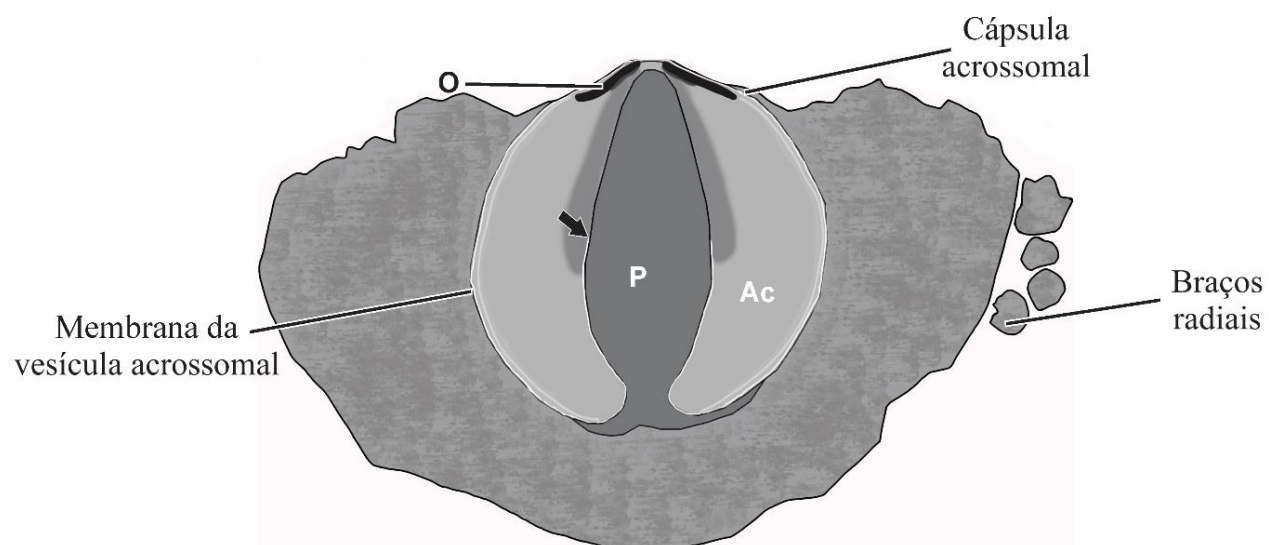
Tabela, figuras e legendas

Tabela 1. Matriz com os estados dos caracteres espermáticos. Caracteres – **1.** Opérculo: imperfurado (0) e perfurado (1); **2.** Botão apical: ausente (0) e presente (1); **3.** Anel opercular acessório: ausente (0) e presente (1); **4.** Cápsula do acrosso: Até na região anterior da base (0) e até na metade perforatorial (1); **5.** Anel espessado eletrodenso”: Ausente (0) e presente (1). ? = informações não existentes.

Espécies	Família	1	2	3	4	5
<i>Varuna litterata</i> ²	Varunidae	0	0	0	?	1
<i>Eriocheir japonica</i> ³		0	0	0	?	?
<i>Eriocheir sinensis</i> ⁴		0	0	0	?	?
<i>Chasmagnatus convexus</i>		?	?	?	?	?
<i>Cyclograpsus integer</i> ¹		0	0	0	1	1
<i>Cyclograpsus punctatus</i> ¹		0	0	0	1	1
<i>Neohelice granulata</i> ¹		0	0	0	1	1
<i>Pseudohelice subquadrata</i>		?	?	?	?	?
<i>Cyrtograpsus angulatus</i> ¹		0	0	0	1	1
<i>Macrophthalmus (Moreotis) definitus</i>	Macrophthalmidae	?	?	?	?	?
<i>Macrophthalmus (Moreotis) purpureocheir</i>		?	?	?	?	?
<i>Mictyris brevidactylus</i>	Mictyridae	?	?	?	?	?
<i>Mictyris longicarpus</i> ^{5, 6}		1	1	0	?	1
<i>Xenograpsus testudinatus</i>	Xenograpsidae	?	?	?	?	?
<i>Leptograpsodes ocdentatus</i>	Leptograpsidae	?	?	?	?	?
<i>Metopograpsus messor</i> ⁷	Grapsidae	1	?	1	?	?
<i>Metopograpsus frontalis</i>		?	?	?	?	?
<i>Grapsus albolineatus</i> ⁸		1	1	?	?	0
<i>Grapsus grapsus</i> ¹		1	1	1	0	0
<i>Pachygrapsus marmoratus</i>		?	?	?	0	?
<i>Pachygrapsus crassipes</i>		?	?	?	?	?
<i>Pachygrapsus transversus</i> ^{1, 9}		1	1	1	0	0
<i>Pachygrapsus gracilis</i> ^{1, 9}		1	1	1	0	0
<i>Geograpsus lividus</i> ^{1, 9}		1	1	1	0	0
<i>Geograpsus crinipes</i>		?	?	?	?	?
<i>Goniopsis pulchra</i>		1	?	?	0	?
<i>Goniopsis cruentata</i> ¹		1	1	1	0	0
<i>Lauridromia dehaani</i> ⁸	Dromiidae (Grupo externo)	1	?	?	?	?
<i>Conchoecetes artificiosus</i>		?	?		?	?

¹ Presente estudo; ²Jamieson et al. (1996); ³Yasuzumi (1960); ⁴Zeng et al. (2019); ⁵Jamieson (1993); ⁶ Jamieson (1994);

⁷Anilkumar et al. (1999); ⁸Jamieson (1991); ⁹Tiseo et al. (2017)

Esquema 1

Esquema 1. Diagrama geral dos espermatozoides de Varunidae e Grapsidae. Ac= Vesícula acrossomal; O= opérculo; P= câmara perforatorial; Seta= cápsula acrossomal.

Figura 1

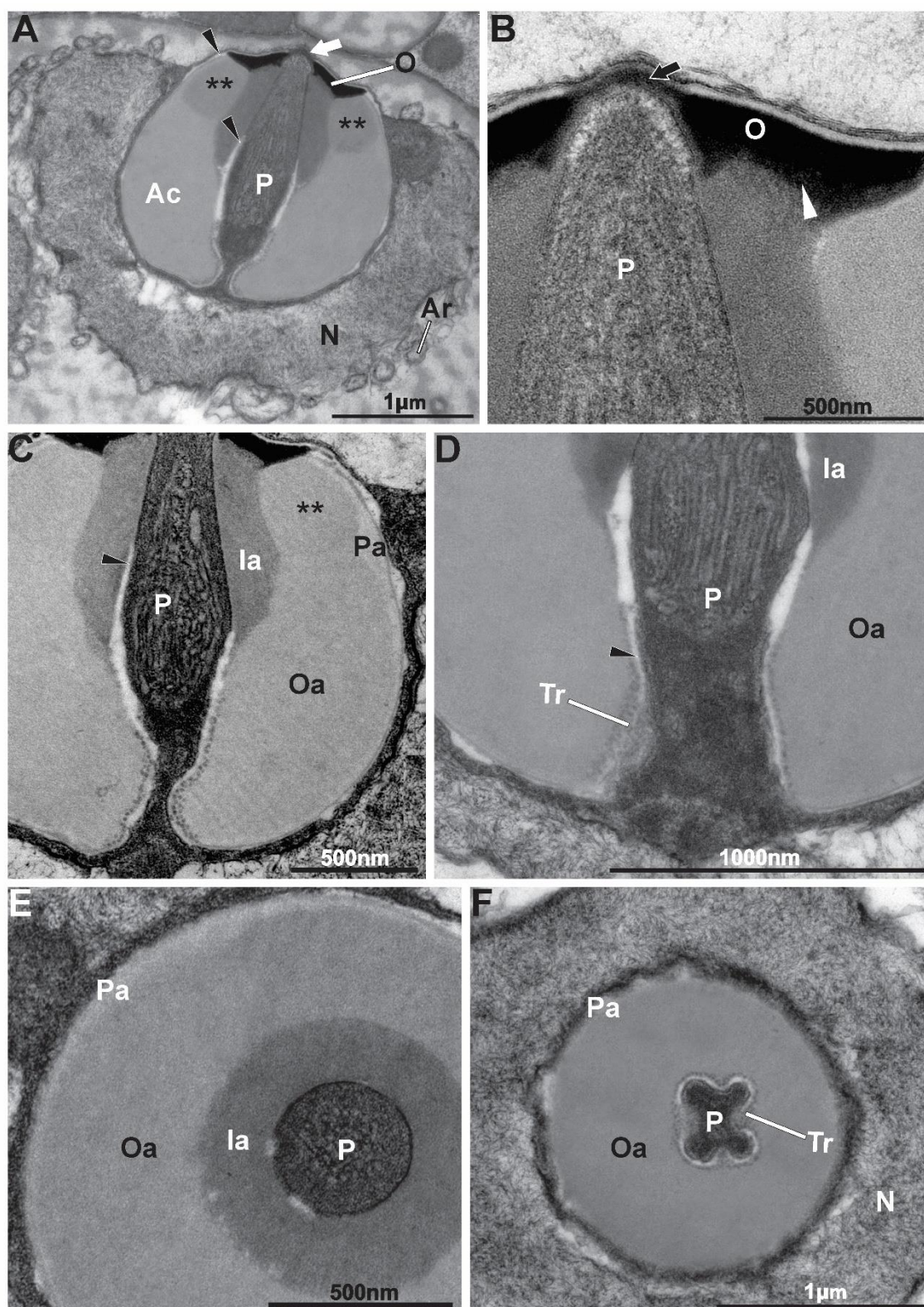


Figura 1. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Cyclograpsus integer*. **A.** Vista longitudinal do espermatozoide ao longo do maior eixo da câmara perforatorial, mostrando a vesícula acrossomal, a câmara perforatorial e o núcleo que preenche quase toda a vesícula acrossomal. Note a presença dos braços radiais e da cápsula acrossomal que se estende desde a margem do opérculo até a metade da câmara perforatorial (cabeças de seta), além da zona espessa e arredondada (**), justaposta ao opérculo. O opérculo possui delgada camada eletrodensa sob o ápice perforatorial (seta). **B.** Ápice da vesícula acrossomal, mostrando o ápice da câmara perforatorial, o opérculo eletrodensa com uma camada delgada eletrodensa ligando as duas áreas periféricas espessas do opérculo (seta) e a região subopercular (cabeça de seta). **C.** Zonas acrossomais. Observe a zona interna mais eletrodensa, a externa, a periférica e a zona espessa e arredondada (**) justaposta ao opérculo. **D.** Detalhe da base da câmara perforatorial, mostrando o anel espessado floculado em contato com a cápsula (cabeça de seta). Nesta seção observa-se ainda as zonas acrossomais interna e externa. **E.** Em corte transversal próximo ao ápice da câmara perforatorial nota-se a zona acrossomal interna, a externa e a periférica. **F.** O corte transversal sob o terço superior da vesícula acrossomal exhibe o anel espessado floculado, além das zonas acrossomais externa e periférica. Ac= vesícula acrossomal; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Tr= Anel espessado.

Figura 2

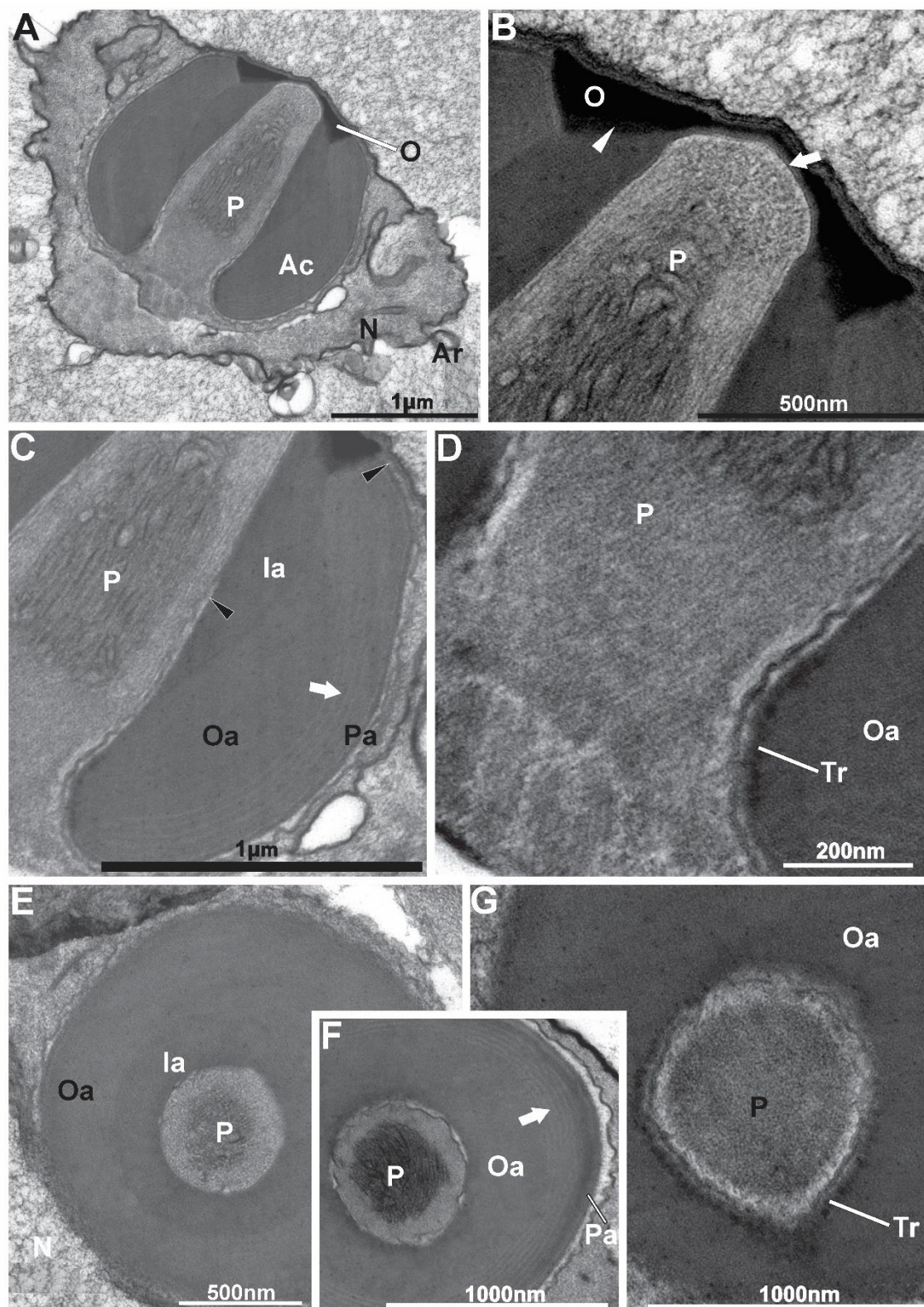


Figura 2. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Neohelice granulata*. **A.** Em corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial observa-se que o espermatozoide de maneira geral é formado pela câmara perforatorial, vesícula acrossomal e região nuclear. Note os braços radiais. **B.** Detalhe do ápice acrossomal, exibindo o opérculo eletrodenso e a região subopercular (cabeça de seta). Note que o ápice arredondado da câmara perforatorial (seta) se estendendo ligeiramente sob a perfuração opercular. **C.** Detalhe da câmara perforatorial, seguida pela zona acrossomal interna, externa e a periférica. Note as lamelas concêntricas presentes na zona acrossomal externa (seta) e a cápsula acrossomal (cabeças de seta). **D.** Detalhe da base da câmara perforatorial, exibindo o anel espessado floculado, circundado pela zona acrossomal externa. **E.** Corte transversal sob o terço superior da vesícula acrossomal, exibindo a zona acrossomal interna e a externa. **F.** Observe as lamelas concêntricas da zona acrossomal externa (seta) e a zona acrossomal periférica delgada. **G.** O corte transversal próximo a base da câmara perforatorial exibe o anel espessado eletrodenso e a zona acrossomal externa. Ac= vesícula acrossomal; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Tr= Anel espessado.

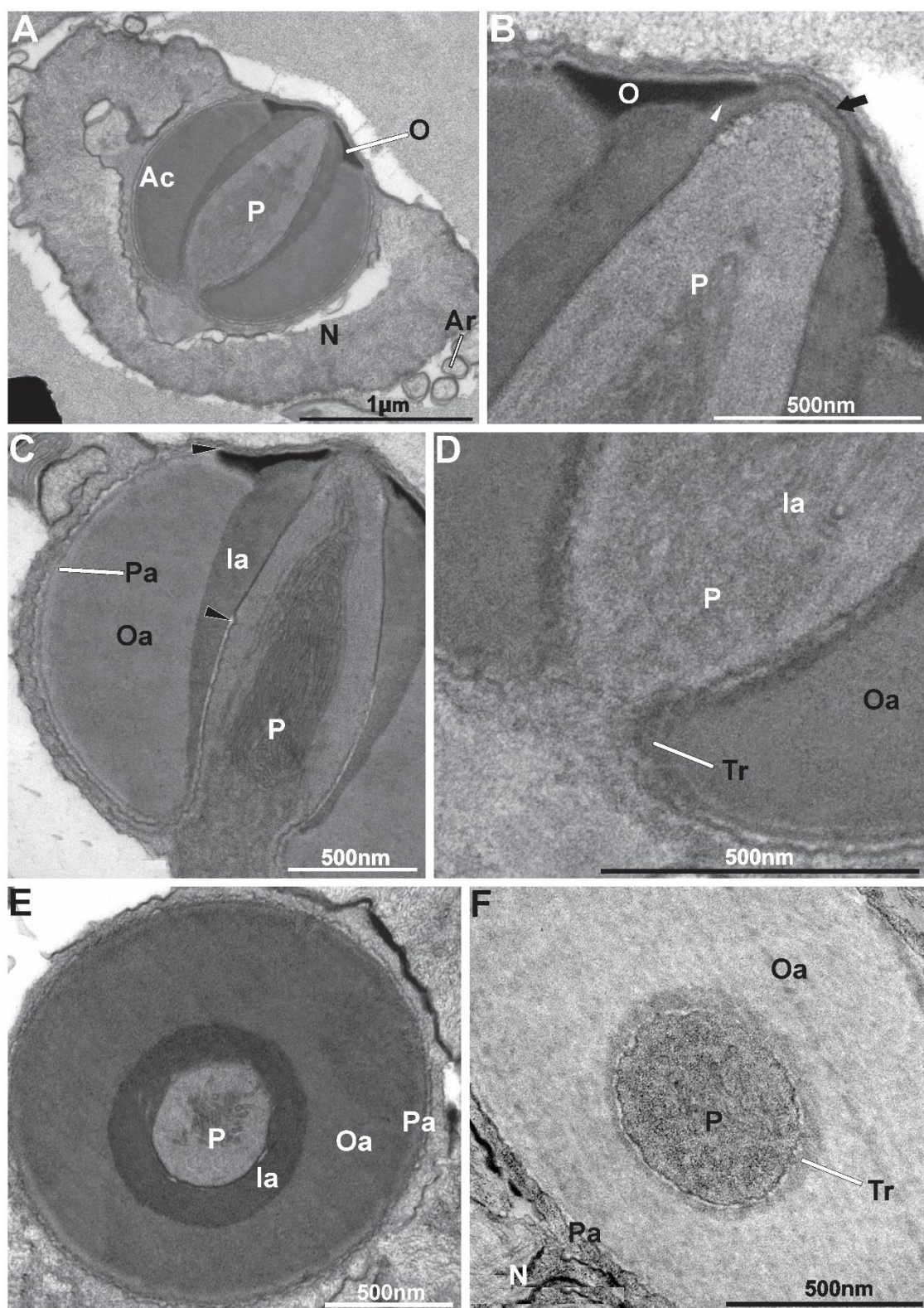
Figura 3

Figura 3. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Cyrtograpsus angulatus*. **A.** Em corte longitudinal sob o maior eixo perforatorial observa-se a vesícula acrossomal, a câmara perforatorial, o núcleo preenchendo quase toda a vesícula acrossomal e os braços radiais. **B.** Ápice do acrossomo, exibindo o opérculo eletrodense e a região subopercular (cabeça de seta). Note a delgada conexão entre as extremidades do opérculo (seta). **C.** Observe a zona acrossomal interna eletrodensa adjacente à câmara perforatorial, a qual é seguida pela zona externa menos eletrodensa que a interna e pela zona acrossomal periférica menos eletrodensa que todas as outras zonas. A cápsula acrossomal tem início no opérculo e termina na metade da câmara perforatorial (cabeça de seta). **D.** Detalhe da base da câmara perforatorial com aspecto curto, mostrando o anel espessado floculado. Note a zona acrossomal externa. **E.** O corte transversal próximo ao terço superior do acrossomo exibe a zona acrossomal interna, a externa e a periférica. **F.** Em corte transversal próximo a base da câmara perforatorial observa-se o anel espessado floculado e as zonas acrossomais externa e periférica. Ac= vesícula acrossomal; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Tr= anel espessado.

Figura 4

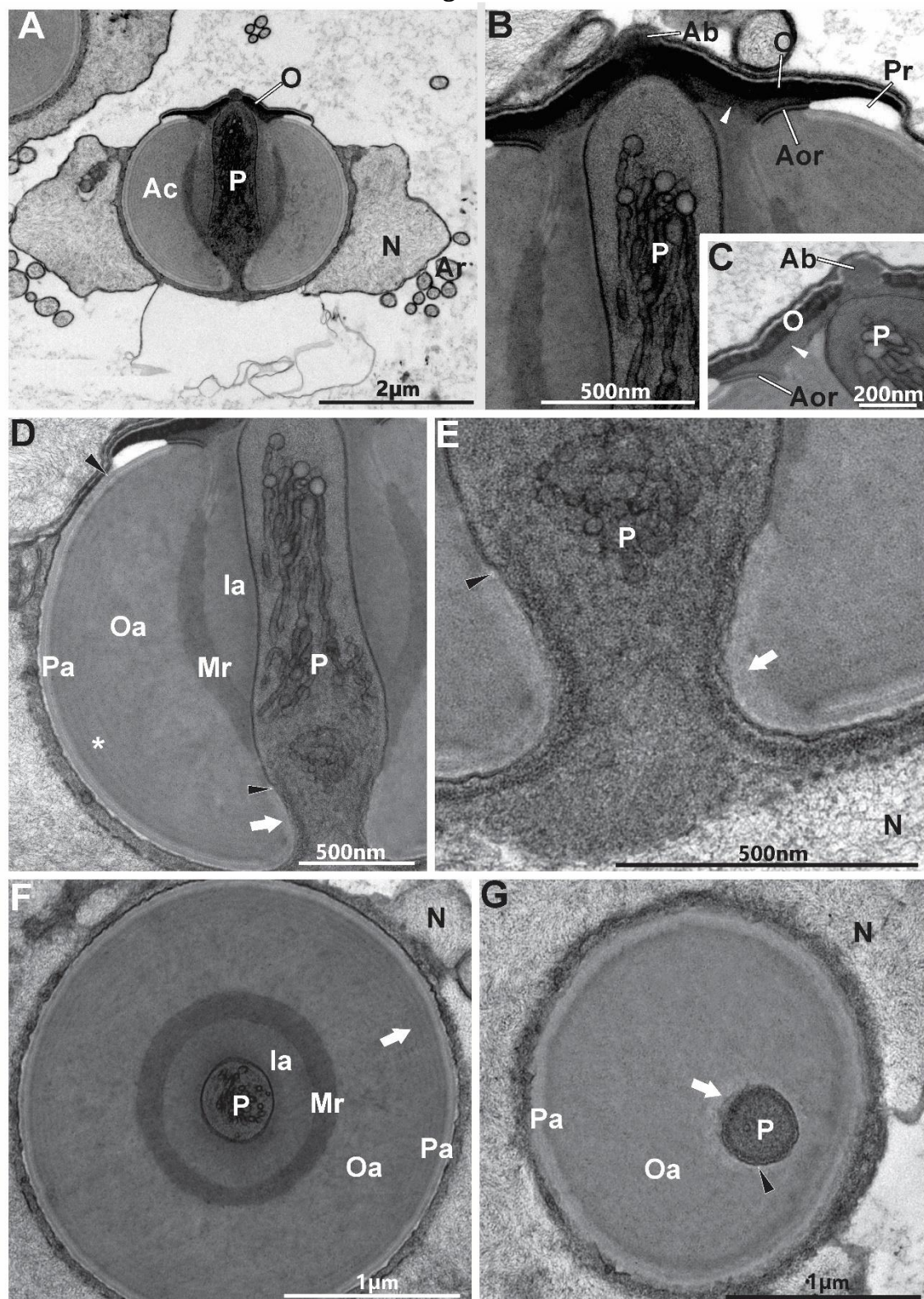


Figura 4. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Grapsus grapsus*. **A.** Corte longitudinal do espermatozoide mostrando a câmara perforatorial panduriforme, vesícula acrossomal, opérculo perfurado e núcleo. Note a presença dos braços radiais do núcleo. **B.** Detalhe do ápice da vesícula acrossomal mostrando o opérculo eletrodenso perfurado, a região subopercular (cabeça de seta), e o botão apical. Observe que esta espécie possui anel opercular acessório e aba periopercular. **C.** O botão apical esférico é observado na região perfurada do opérculo. Observe a região subopercular (cabeça de seta). **D.** Câmara perforatorial envolvida pela zona acrossomal interna. O anel xantídeo modificado é contínuo com a camada menos eletrodensa que envolve a câmara perforatorial (seta). Note a cápsula acrossomal (cabeças de seta) terminando na região anterior da camada menos eletrodensa e as lamelas concêntricas da zona acrossomal externa (asterisco). **E.** Detalhe da base da câmara perforatorial, limite da cápsula (cabeça de seta) e região menos eletrodensa envolvendo a base da câmara perforatorial (seta). **F.** O corte transversal próximo à região central do acrossomo exibe a câmara perforatorial, sem a cápsula entre ela e a vesícula acrossomal. A zona acrossomal interna é separada da externa pelo anel xantídeo modificado. A zona acrossomal externa exibe lamelas concêntricas (seta) e a periférica é a menos eletrodensa de todas. **G.** Em corte transversal próximo a base da câmara perforatorial, observa-se a região menos eletrodensa que a envolve (seta), posicionada ao redor da cápsula (cabeça de seta). Ab= botão apical; Ac= vesícula acrossomal; Aor= anel opercular acessório; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; Mr= anel xantídeo modificado; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Pr= aba periopercular.

Figura 5

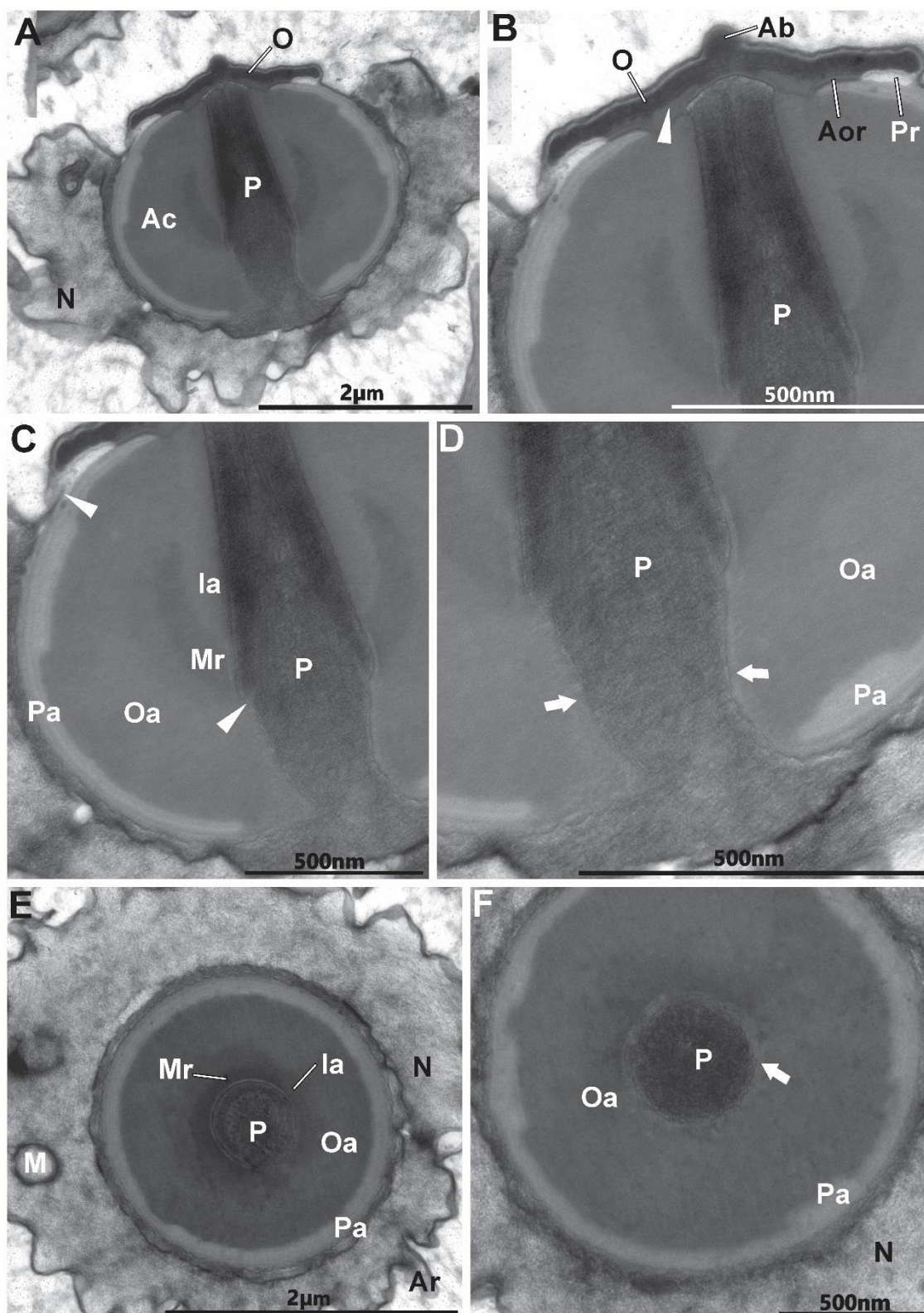


Figura 5. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Pachygrapsus transversus*. **A.** Em corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial observa-se que o espermatozoide é formado pela vesícula acrossomal, câmara perforatorial, opérculo perfurado e núcleo, com a presença dos braços radiais. **B.** Detalhe do ápice do acrossoma, exibindo opérculo eletrodenso centralmente perfurado, a região subopercular (cabeça de seta), botão apical, anel opercular acessório e a aba periopercular. **C.** Câmara perforatorial envolvida pela zona acrossomal interna que é circundada pelo anel xantídeo modificado. Nota-se ainda a cápsula acrossomal (cabeças de seta) que se estende desde à margem da aba periopercular até a região anterior da base perforatorial. **D.** Detalhe da base da vesícula acrossomal exibindo a região menos eletrodensa (setas) que envolve a base da câmara perforatorial, seguida pelas zonas acrossomais externa e a periférica. **E.** Em corte transversal próximo à região intermediária do acrossomo observa-se que a câmara perforatorial é envolvida pela zona acrossomal interna, seguida pelo anel xantídeo modificado, zona acrossomal externa e periférica. **F.** O corte transversal próximo a base da câmara perforatorial exhibe a região menos eletrodensa circundando a câmara perforatorial (seta), além das zonas acrossomais externa e periférica. Ab= botão apical; Ac= vesícula acrossomal; Aor= anel opercular acessório; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; M= mitocôndria; Mr= anel xantídeo modificado; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Pr= aba periopercular.

Figura 6

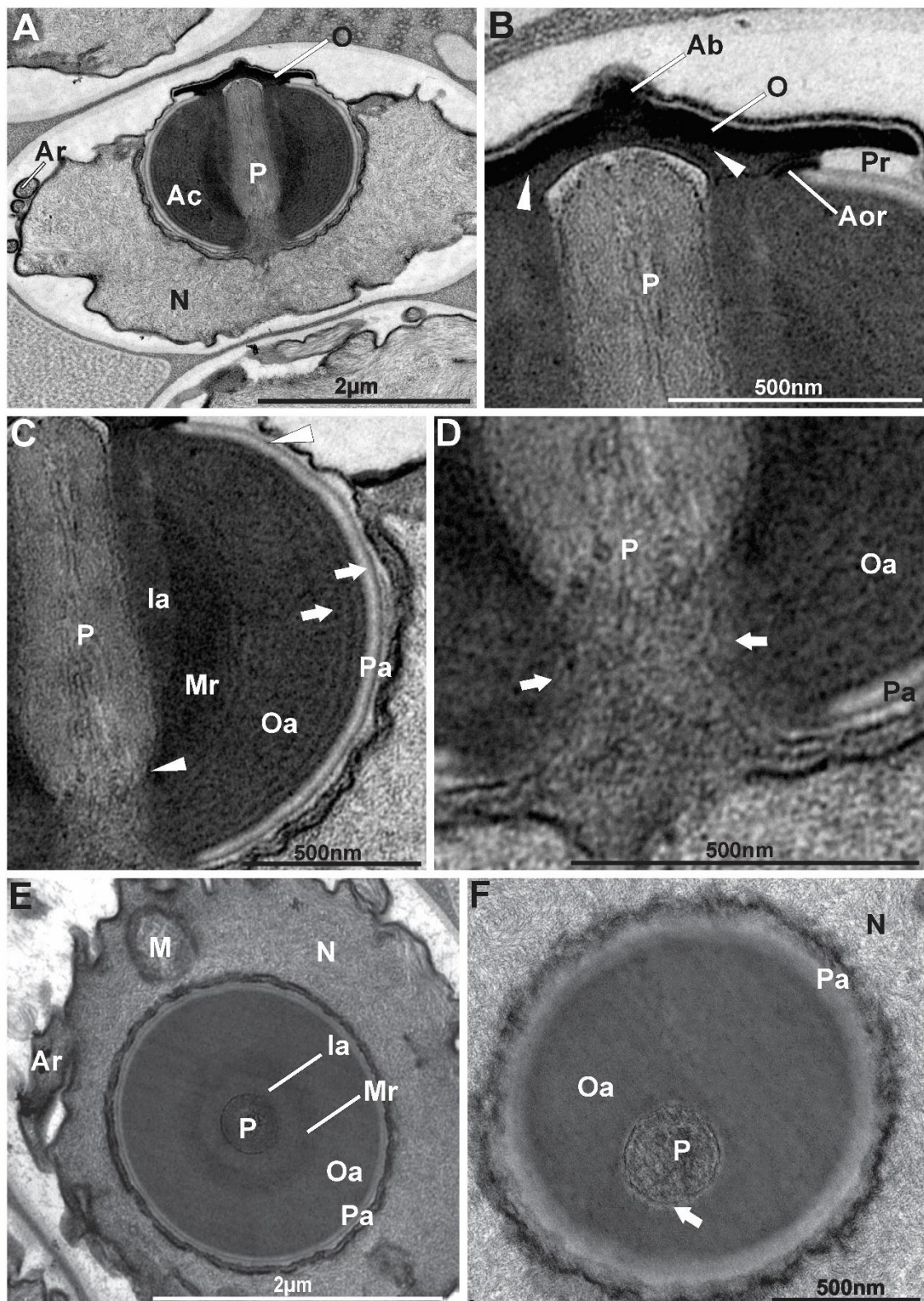


Figura 6. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Pachygrapsus gracilis*. **A.** O corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial mostra que o espermatozoide é constituído pela câmara perforatorial, vesícula acrossomal, opérculo perfurado e núcleo, com a presença dos braços radiais. **B.** Detalhe do ápice acrossomal, exibindo o opérculo eletrodenso perfurado, a região subopercular (cabeças de seta), botão apical, anel opercular acessório e a aba periopercular. **C.** A câmara perforatorial faz limite com a zona acrossomal interna e anel xantídeo modificado, o qual é envolvido pela zona acrossomal externa e, conseqüentemente, pela periférica. Observe que ambas as zonas externa e periférica exibem lamelas concêntricas (setas) e que a cápsula se inicia nas margens da aba periopercular e termina na região anterior da base perforatorial (cabeças de seta). **D.** Detalhe da base da vesícula acrossomal exibindo a região menos eletrodensa que envolve a câmara perforatorial (setas). Note a zona acrossomal externa lamelada e a zona periférica. **E.** Em corte transversal próximo à região intermediária do acrossomo observa-se que a câmara perforatorial é envolvida pela zona acrossomal interna, seguida pelo anel xantídeo modificado e demais zonas acrossomais. **F.** O corte transversal próximo a base da câmara perforatorial exhibe a região menos eletrodensa circundando a câmara perforatorial (seta), além das zonas acrossomais externa e a periférica. Ab= botão apical; Ac= vesícula acrossomal; Aor= anel opercular acessório; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; Mr= anel xantídeo modificado; M= mitocôndria; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Pr= aba periopercular.

Figura 7

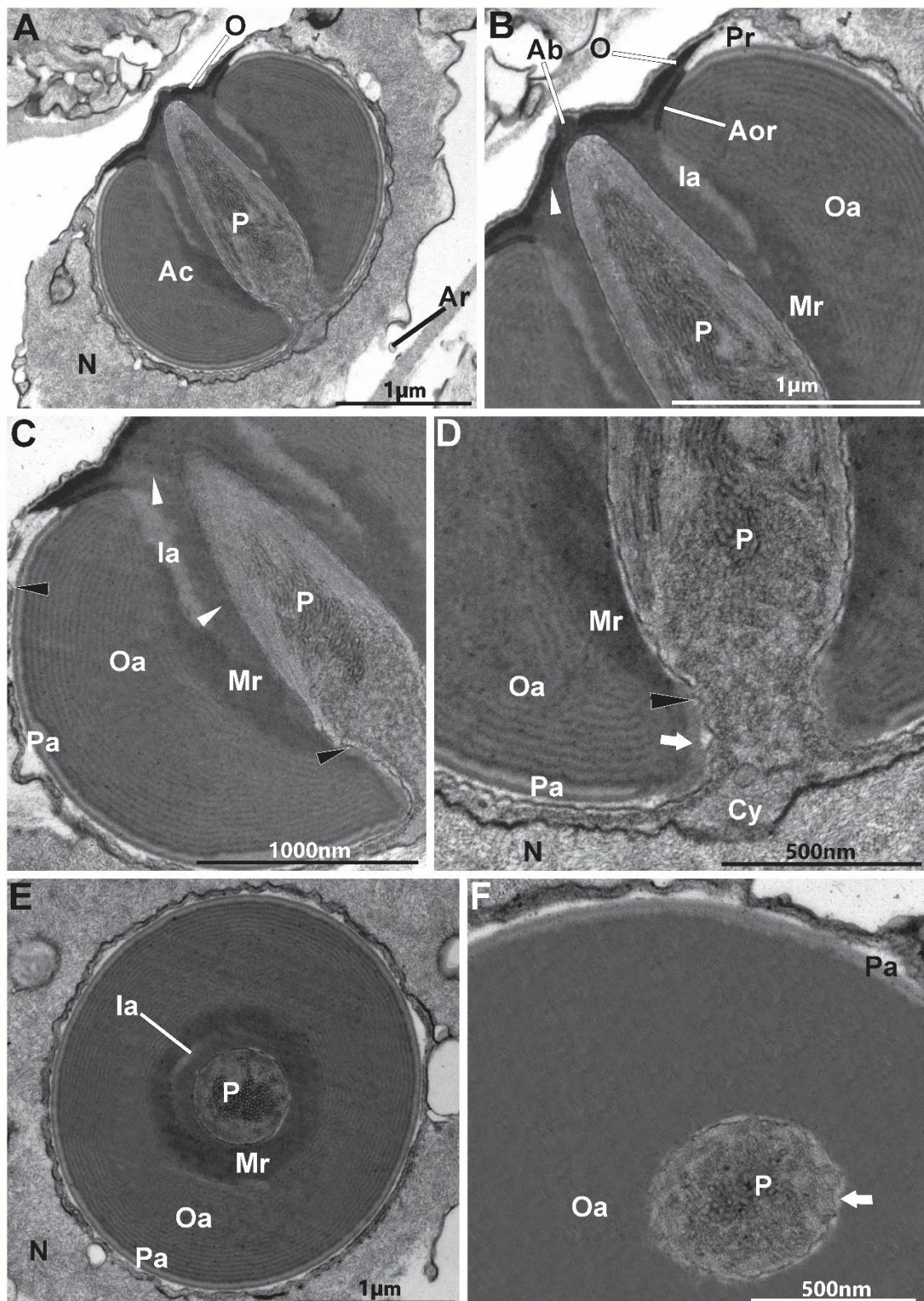


Figura 7. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Geograpsus lividus*. **A.** O corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial mostra que o espermatozoide é formado pela câmara perforatorial, vesícula acrossomal, opérculo perfurado e núcleo. **B.** Detalhe do ápice da vesícula acrossomal exibindo o opérculo eletrodenso perfurado, região subopercular (cabeça de seta), botão apical, anel opercular acessório e aba periopercular. **C.** A Câmara perforatorial é envolvida pela região subopercular que a acompanha até próximo da base perforatorial (cabeças de setas brancas), a qual é seguida pela zona acrossomal interna. Note ainda o anel xantídeo modificado, a zona acrossomal externa, com a presença de lamelas concêntricas, a zona acrossomal periférica e a cápsula acrossomal (cabeças de seta preta). **D.** Detalhe da base do acrossomo, exibindo a delgada cápsula acrossomal (cabeça de seta) que ocorre até a região anterior da região menos eletrodensa que envolve a câmara perforatorial (seta). Observe ainda porções do anel xantídeo modificado, a zona acrossomal externa e a periférica. **E.** O corte transversal próximo à região intermediária do acrossomo exibe a câmara perforatorial, seguida pelas zonas acrossomais e o anel xantídeo modificado. **F.** Em corte transversal próximo a base da câmara perforatorial nota-se a cápsula acrossomal circundando a câmara perforatorial (seta), além das zonas acrossomais externa e a periférica. Ab= botão apical; Ac= vesícula acrossomal; Aor= anel opercular acessório; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; Mr= anel xantídeo modificado; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Pr= aba periopercular.

Figura 8

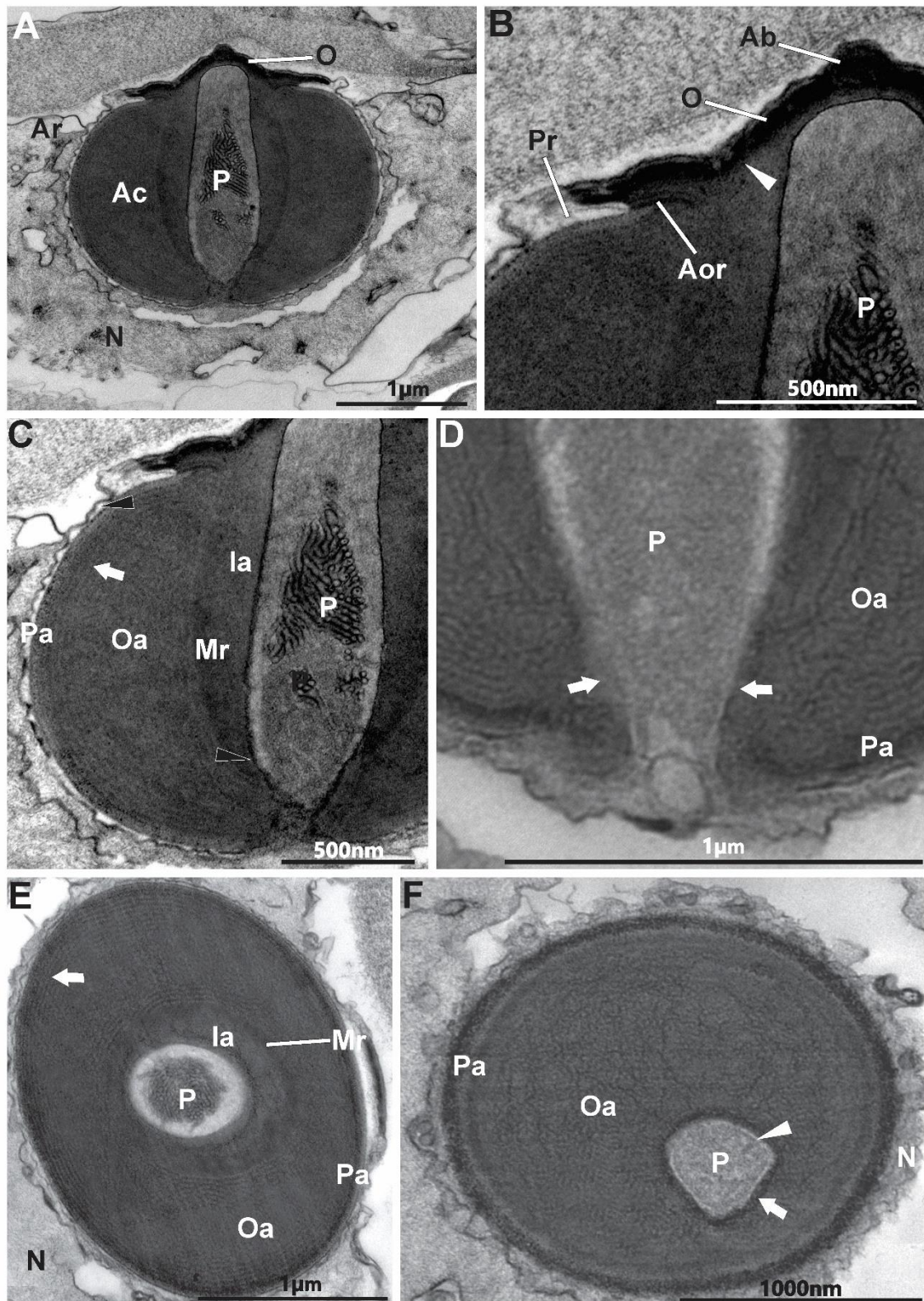


Figura 8. Ultraestrutura dos espermatozoides de *Goniopsis cruentata*. **A.** Em corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial nota-se o espermatozoide formado pela câmara perforatorial, vesícula acrossomal, opérculo perfurado e núcleo, com a presença dos braços radiais. **B.** Ápice da vesícula acrossomal exibindo o opérculo eletrodense perfurado, região subopercular (cabeça de seta), botão apical, anel opercular acessório e a aba periopercular. **C.** Câmara perforatorial envolvida pela cápsula acrossomal que ocorre desde o início das margens laterais da aba periopercular (cabeças de seta) e zona acrossomal interna, seguida pelo anel xantídeo modificado. Note a zona acrossomal externa, com a presença de lamelas concêntricas (seta) e a zona acrossomal periférica mais eletrodensa. **D.** Detalhe da base da vesícula acrossomal mostrando a região menos eletrodensa que circunda a base da câmara perforatorial (setas). Observe porções da zona acrossomal externa lamelada e da periférica. **E.** O corte transversal próximo à região intermediária do acrossomo exibindo a câmara perforatorial, seguida pela zona acrossomal interna, anel xantídeo modificado e zonas acrossomais externa e periférica. Note as lamelas da zona acrossomal externa (seta). **F.** Em corte transversal próximo a base da câmara perforatorial nota-se a cápsula acrossomal (cabeça de seta) circundada pela região menos eletrodensa (seta), além das zonas acrossomais externa e periférica. Ab= botão apical; Ac= vesícula acrossomal; Aor= anel opercular acessório; Ar= braços radiais; Ia= zona acrossomal interna; Mr= anel xantídeo modificado; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Pr= aba periopercular.

Figura 9

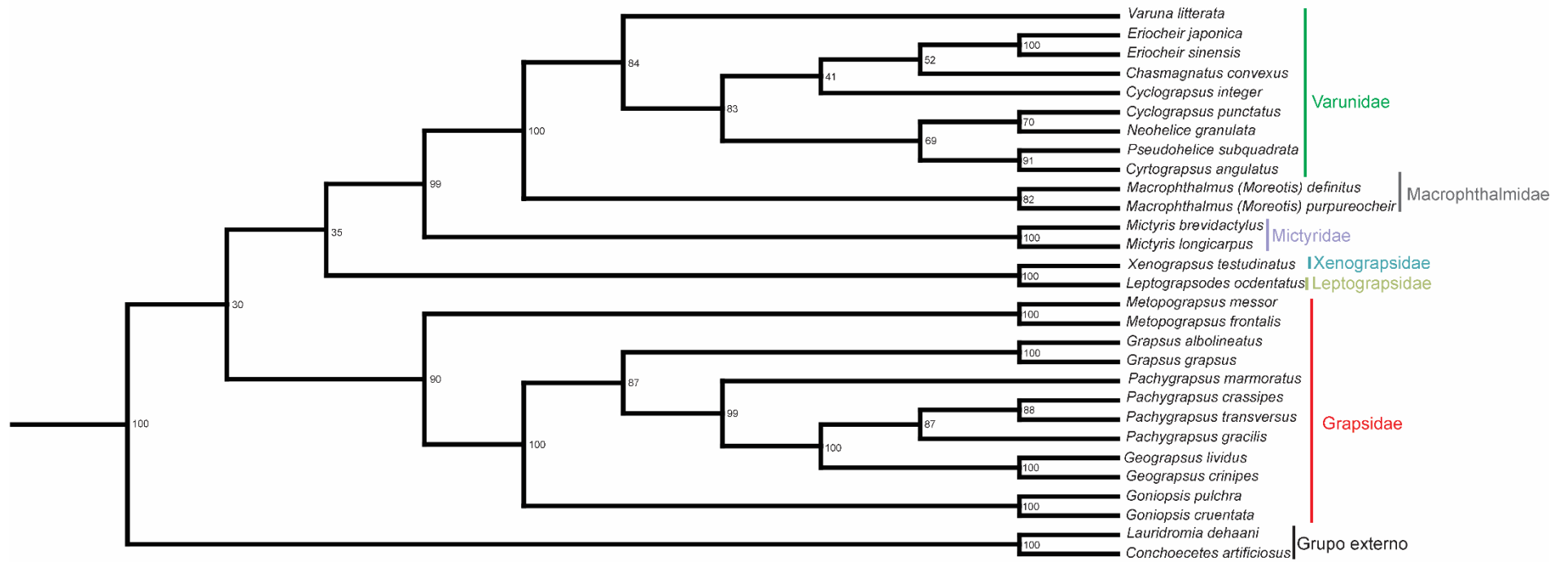


Figura 9. Filograma obtido a partir da Máxima verossimilhança. Suporte de clado= bootstrap.

Figura 10

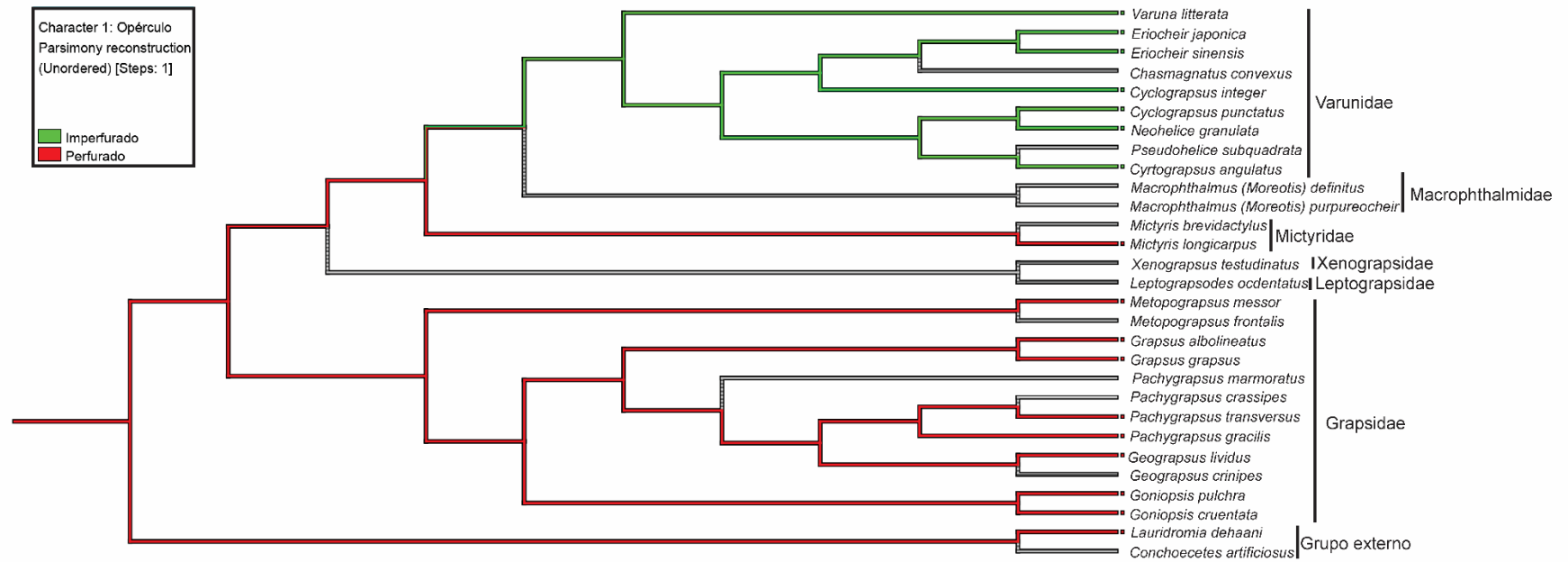


Figura 10. Mapeamento do caráter “Opérculo”. A cor verde indica espécies com opérculo imperfurado e a cor vermelha ter opérculo perfurado. O cladograma apresentado indica que o opérculo perfurado é o caráter plesiomórfico às famílias de Thoracotremata analisadas, sendo o opérculo imperfurado sinapomorfia de Varunidae.

Figura 11

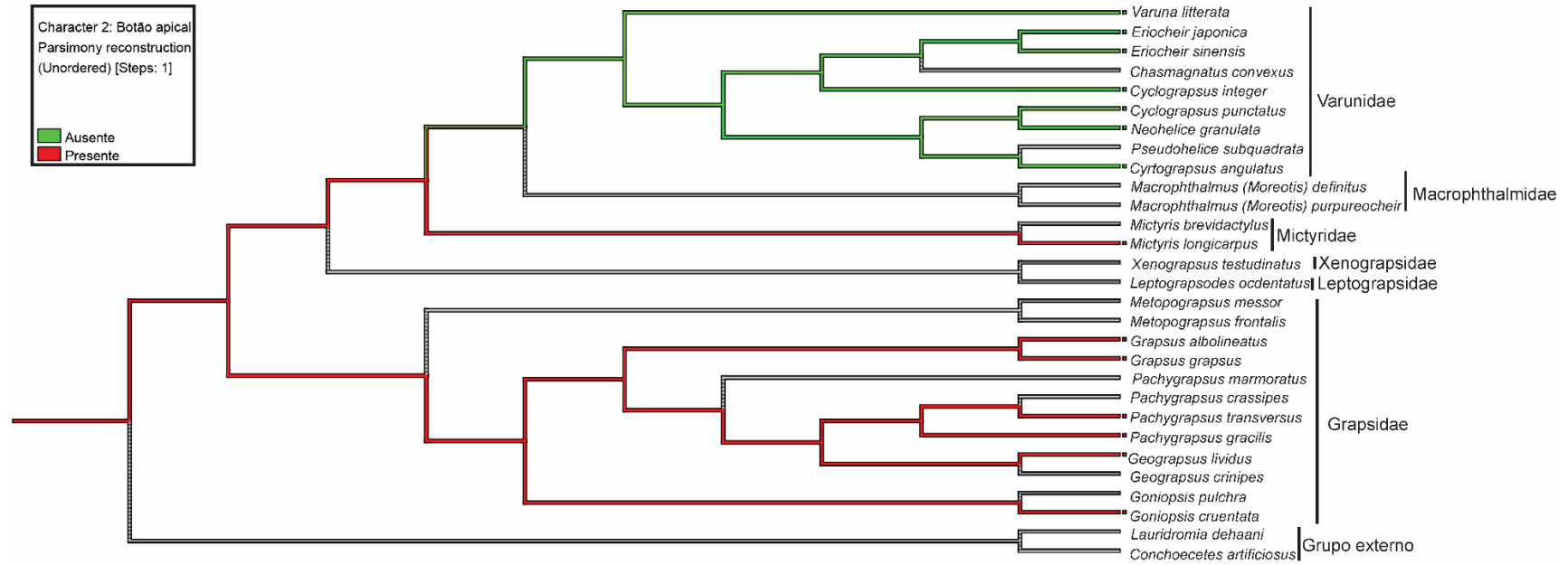


Figura 11. Caráter “Botão apical”. A cor verde indica a ausência de botão apical, considerada sinapomorfia de Varunidae. A cor vermelha indica a presença do botão apical, sendo este caráter plesiomórfico ao clado analisado.

Figura 12

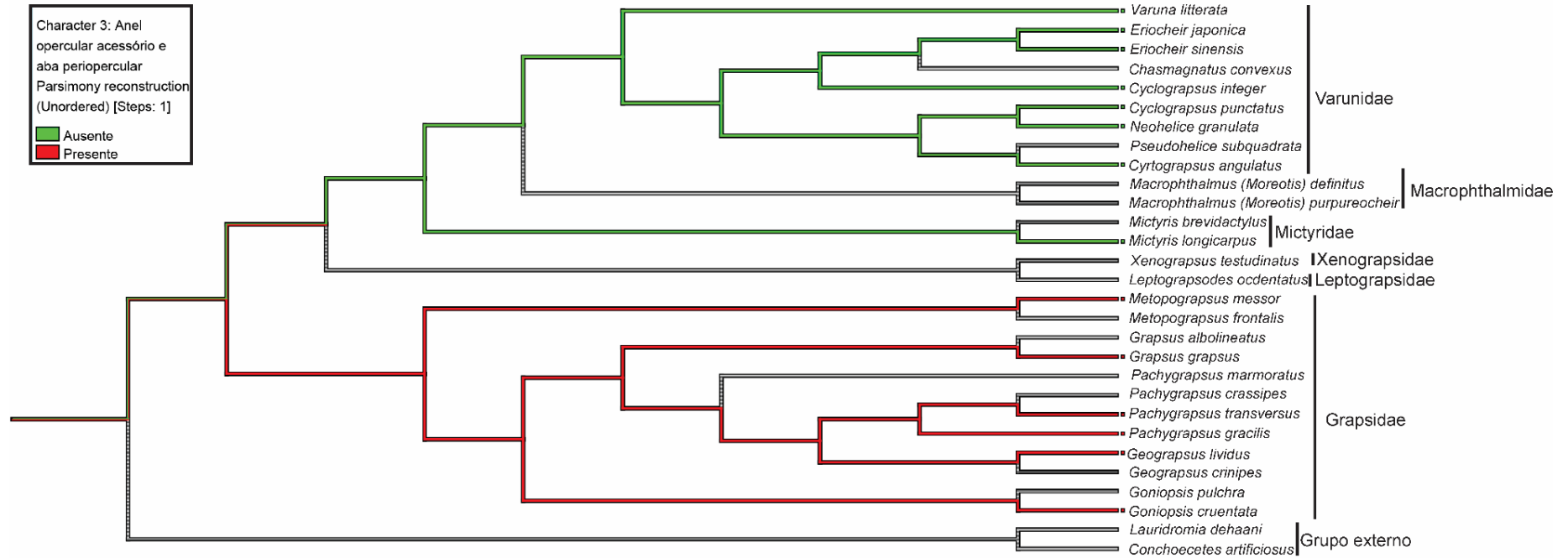


Figura 12. Caracteres “Anel opercular acessório” e “Aba periopercular”. O cladograma mostra em verde, a ausência do anel opercular acessório e aba periopercular e em vermelho indicando a presença destas estruturas. Note que o anel opercular acessório e a aba periopercular são característicos aos representantes de Grapsidae e sua ausência é marca do clado formado por Varunidae.

Figura 13

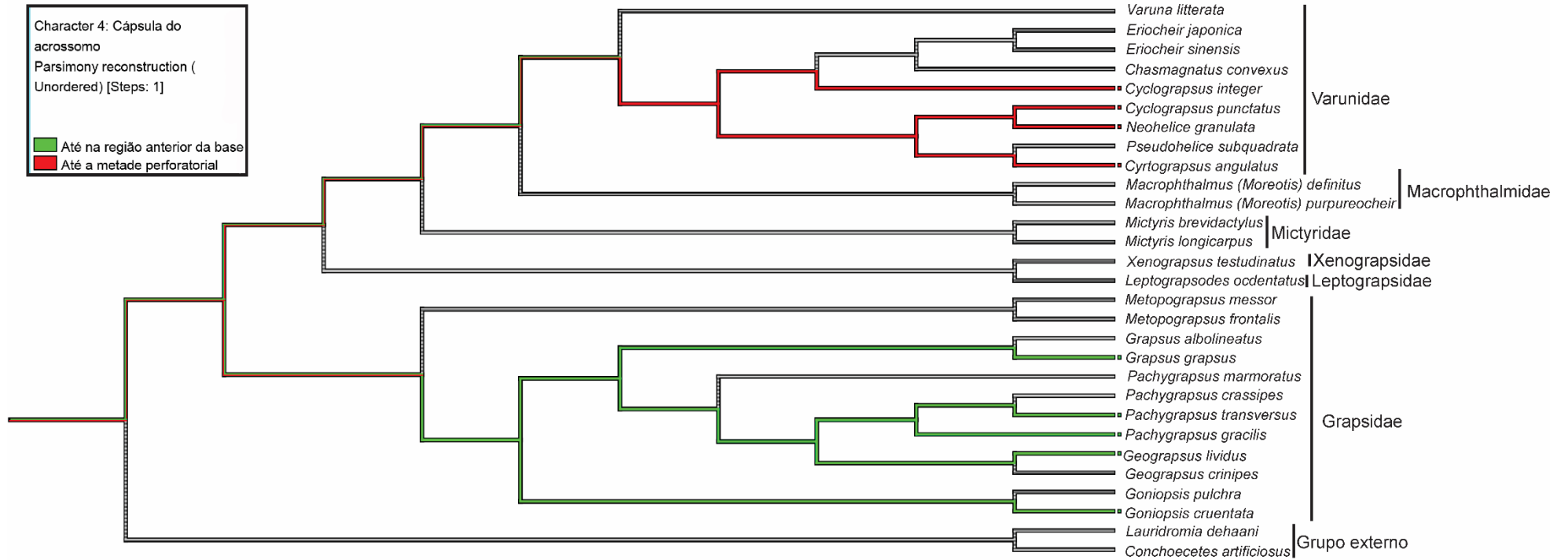


Figura 13. Mapeamento do caráter “Cápsula do acrossomo”. Este cladograma mostra a reconstrução de estado ancestral do caráter “cápsula do acrossomo”, sendo que em verde a cápsula que se estende até a região superior da base perforatorial e em vermelho até a metade perforatorial. Note que a cápsula até a metade da câmara perforatorial é sinapomorfia de Varunidae.

Figura 14

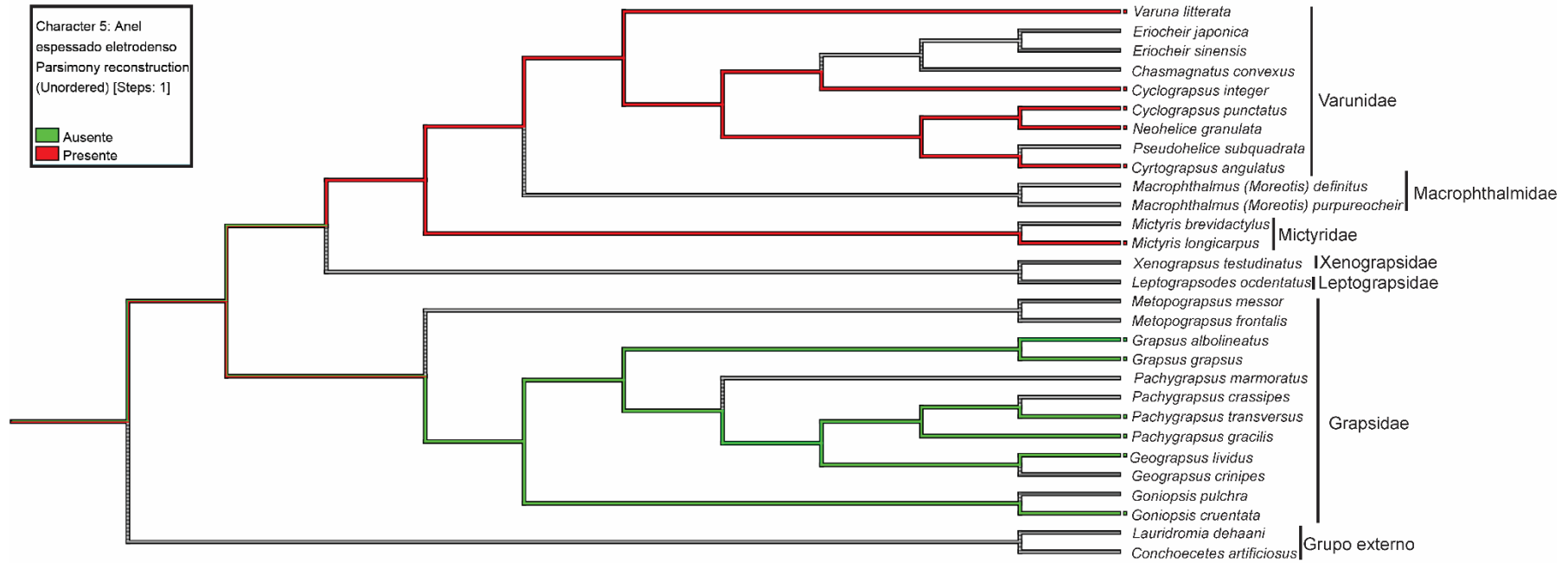


Figura 14. Caráter “Anel espessado eletrodenso”. Este cladograma mostra a reconstrução de estado ancestral do caráter “anel espessado eletrodenso”, sendo em verde ausente e vermelho presente. Observe que de maneira exclusiva, Grapsidae compartilha a ausência do anel espessado eletrodenso.

Discussão

Em geral, as espécies aqui estudadas compartilham a presença de espermatozoides esféricos ou elípticos, formados por vesícula acrossomal, constituída por diferentes zonas acrossomais concêntricas, opérculo eletrodenso e núcleo preenchido por cromatina, com a presença dos braços radiais. Tais características são comuns para a maioria dos representantes de Thoracotremata (Jamieson, 1991, 1994; Jamieson & Tudge, 2000). Porém, foram observadas diferenças importantes em relação a outros Thoracotremata, como a ausência do botão apical e um opérculo não perfurado, os quais foram verificados nos Varunidae aqui estudados e, também, em *V. litterata* Jamieson et al. (1996), *E. sinensis* Wang et al. (2015) e Zeng et al. (2019) e aparentemente na imagem incompleta (figura 8) de *E. japonica* em Yasuzumi (1960). O opérculo não perfurado e a ausência do botão apical também são caracteres da única espécie de Macrophthalmidae *Macrophthalmus (Macrophthalmus) crassipes* H. Milne Edwards, 1852, com ultraestrutura do espermatozoide conhecida (Jamieson, 1991; 1994). Porém, em *M. crassipes*, o opérculo é homoganeamente espesso, sem área delgada sobre o ápice da câmara perforatorial, como em Varunidae. Macrophthalmidae e Varunidae formam clados irmãos na filogenia molecular, e assim, estas características operculares são compartilhadas pelas famílias. Por outro lado, o opérculo perfurado e botão apical estão presentes no Myctiridae *Myctiris longicarpus* Latreille, 1806 (Jamieson, 1991; 1994). Pela filogenia molecular, Myctiridae forma um segundo clado com Varunidae e Macrophthalmidae. Todos os Grapsidae aqui estudados e aqueles conhecidos na literatura (Jamieson, 1991; 1994; Anilkumar et al. 1999; Tiseo et al., 2017) tem opérculo perfurado e botão apical. Tendo em vista que Grapsidae é grupo irmão de todas as outras famílias da filogenia molecular, é possível propor para Xenograpsidae e Leptograpsidae, os quais não tem nenhum espermatozoide descrito, que o botão apical e o opérculo devem ser características para a maioria das espécies. Porém, estudos posteriores podem confirmar essa hipótese. Em linha com esta proposta, outras famílias de Thoracotremata têm botão apical e opérculo perfurado, como Pinnotheridae De Haan, 1833, Ocypodidae Rafinesque, 1815, Sesarmidae e Gecarcinidae (Jamieson, 1991, 1994; Jamieson & Tudge, 2000; Becker et al., 2013; Caps. II e III da presente tese). Desta maneira, apesar de ser clara a necessidade de uma análise completa com outras famílias de Thoracotremata, pode-se considerar a ausência de botão apical e opérculo não perfurado como uma das sinapomorfias que une os Varunidae e Macrophthalmidae, enquanto para as demais famílias de Thoracotremata, a presença do botão apical pode ser considerada uma

plesiomorfia. De maneira exclusiva, somente a família Varunidae apresenta cápsula da vesícula acrossomal progredindo como um espaço até a altura da metade da câmara perforatorial, demonstrando ser a sinapomorfia da família. Em todos os Thoracotremata descritos na literatura (Tabela 1), exceto em uma espécie de Pinnotheridae (ver capítulo II da presente tese), a cápsula termina na margem anterior do anel espessado, mesmo quando este anel é descrito como ausente, como no caso de Grapsidae (Jamieson, 1991, 1994; Jamieson & Tudge, 2000; Tiseo et al., 2017).

Nos Varunidae estudados, a câmara perforatorial apresentou morfologia deltóide, sendo estreita em *C. integer* e *Cyr. angulatus*, e muito profundamente deltóide em *N. granulata*. O ápice da câmara perforatorial foi uma característica bastante variável entre as espécies, no qual *C. integer* apresentou ápice estreito e arredondado, projetando-se do opérculo perfurado, enquanto em *Cyr. angulatus* e *N. granulata*, o ápice da câmara perforatorial é largo e arredondado, atingindo apenas o opérculo. Além disso, a margem periférica do opérculo exibiu algumas características morfológicas distintas para a família, sendo assimétrica em *C. integer* e triangular em *N. granulata* e *Cyr. angulatus*. De acordo com a filogenia proposta neste trabalho, as espécies *N. granulata* e *Cyr. angulatus* compartilham um ancestral comum próximo, e a presença de um ápice perforatorial arredondado e um opérculo com margem triangular, podem ser sinapomorfias do clado. Estes mesmos caracteres nos varunídeos descritos na literatura [*C. punctatus* (Jamieson & Tudge, 2000), *V. litterata* (Jamieson et al., 1996), *E. japonica* (Yasuzumi, 1960) e *E. sinensis* (Zeng et al., 2019)], exibem um padrão similar com ápice perforatorial arredondado, porém, as margens operculares são mais assimétricas. Desta forma, o ápice da câmara perforatorial arredondado e margens operculares laterais assimétricas indica ser um caráter plesiomórfico em Varunidae. Adicionalmente, a ausência da aba periopercular e do anel opercular acessório também foi característico entre os representantes aqui descritos e nos caranguejos descritos, indicando ser mais duas sinapomorfias desta família.

Em geral, os Grapsidae deste estudo compartilham a presença do botão apical, cápsula do acrossomo até a região anterior da base da câmara perforatorial, aba periopercular e anel opercular acessório. A aba periopercular e anel opercular acessório são sinapomorfias de Grapsidae e estão ausentes no clado irmão, onde estão Varunidae, Macrophthalmidae e Myctiridae, afirmação esta passível de ser sustentada ao verificarmos as imagens disponíveis na literatura científica envolvendo os grapsídeos (Yasuzumi 1960; Jamieson, 1991; 1994; Jamieson et al., 1996; Wang et al., 2015; Zeng et al., 2019) e a

matriz de caracteres no trabalho de (Jamieson, 1994). Por outro lado, estes caracteres ocorrem em outros clados não diretamente relacionados em Thoracotremata, sendo a aba periopercular e anel opercular acessório caracteres homoplásicos. Adicionalmente, e de maneira exclusiva, somente em seus representantes, ocorre a ausência de anel espessado, que aqui parece presente, porém menos eletrodenso. Este padrão é distinto de Varunidae e todos os outros Thoracotremata descritos na literatura, uma vez que seus representantes possuem um anel espessado eletrodenso (Jamieson, 1991, 1994; Jamieson et al., 1996; Becker et al., 2013; Jamieson & Tudge, 2000). Desta maneira, pode-se considerar que uma das sinapomorfias de Grapsidae é ausência do anel espessado ou, talvez presente, porém com um aspecto menos eletrodenso.

Os Grapsidae deste estudo apresentaram anel xantídeo modificado, embora estudos recentes com a família, tenham considerado este anel como uma zona convencional, a camada dois, das cinco zonas acrossomais como realizado por Tiseo et al. (2017). Ao realizarmos uma comparação com outros representantes de Thoracotremata previamente descritos cujo o anel xantídeo está presente, observa-se uma alta similaridade estrutural com o Mictyridae *M. longicarpus* e o Ocypodidae *Ocypode ceratophthalmus* (Pallas, 1772) como *O. ceratophthalma* Jamieson et al. (1996). Por outro lado, diferenças maiores como a espessura e posição do anel xantídeo modificado podem ser conferidas Gecarcinidae *Cardisoma carnifex* (Herbst, 1796) e *Cardisoma guanhumi* Latreille in Latreille, Le Peletier, Serville & Guérin, 1828 (Jamieson, 1994; Jamieson et al., 1996; Benetti et al., 2013). Nos caranguejos grapsídeos e nos gêneros *Mictyris* e *Ocypode*, o anel xantídeo tem início na região anterior da base da câmara perforatorial ou na região anterior do anel espessado e se estende em direção ao ápice do acrossomo, apresentando uma forma mais delgada e em meia-lua. Por sua vez, em *Cardisoma*, esta estrutura tem início desde a base do anel espessado junto a câmara perforatorial e é mais espessa (Jamieson et al., 1996; Benetti et al., 2013). A comparação da presença deste anel e a relação filogenética indica que o anel xantídeo modificado compartilhado entre Grapsidae e Myctiridae parece ser uma característica plesiomórfica, com provável ocorrência em Xenograpsidae e Leptograpsidae, como o opérculo perfurado e botão apical. Por outro lado, estão ausentes em Varunidae e Macrophthalmidae. Apesar das famílias Gecarcinidae e Ocypodidae não terem sido incluídas na árvore filogenética deste estudo, a filogenia geral de Thoracotremata (ver capítulo I da presente tese) demonstra que o anel xantídeo modificado é homoplásico com Ocypodidae. A filogenia molecular proposta por Tsang et al. (2022) fornece suporte ao clado e à proposta apresentada neste capítulo da tese, uma

vez que também demonstra uma maior proximidade entre os representantes da superfamília Grapsoidea e os Ocypodoidea das famílias Macrophthalmidae e Mictyridae, enquanto compartilham um ancestral comum mais distante com os representantes de Ocypodidae. O anel xantídeo típico arredondado é característico dos Heterotremata Xanthidae MacLeay, 1838 e Panopeidae Ortmann, 1893, sendo considerado uma autapomorfia dessas famílias. No entanto, em Thoracotremata, o anel xantídeo modificado é considerado um caráter com desenvolvimento independente e não relacionado aos xantídeos (Jamieson, 1994).

Os espermatozoides dos Grapsidae *G. grapsus*, *P. gracilis*, *P. transversus* e *Go. cruentata* são mais semelhantes entre si, sendo que as principais diferenças foram em relação a morfologia da câmara e ápice perforatorial, e da zona acrossomal interna. Em *G. grapsus*, a câmara perforatorial tem forma panduriforme, com ápice estreito e arredondado, enquanto o acrossomo possui zona interna com morfologia ampla e curvada. Em *Pachygrapsus* e *Go. cruentata* a câmara perforatorial é do tipo piriforme e seu ápice é amplo e arredondado, e a zona acrossomal interna é ampla e reta, enquanto *Go. cruentata*, o ápice é ligeiramente plano e a zona acrossomal interna é ampla e curvada. Além disso, nota-se que em *G. grapsus*, *Ge. lividus* e *Go. cruentata*, as regiões mais centrais do opérculo e o ápice perforatorial são estendidos em direção ao polo anterior do espermatozoide — considerada como a região que possui o opérculo e botão apical —, ultrapassando a altura do limite das margens operculares laterais, o que quase não ocorre em *P. gracilis* e *P. transversus*. Estas características apresentadas podem ser autapomorfias destas espécies.

As lamelas concêntricas da zona acrossomal externa é uma característica compartilhada entre todos os representantes de Grapsidae, sendo que entre os Varunidae estudados, esta estrutura parece ocorrer apenas em *N. granulata*. Ao analisar espécies da literatura, as lamelas concêntricas foram também observadas em espécies próximas na filogenia molecular, como nos Varunidae *E. japonica*, *E. sinensis*, *C. punctatus*, Macrophthalmidae *M. crassipes*, Mictyridae *M. longicarpus* e gecarcinídeos (Yasuzumi, 1960; Jamieson, 1991, 1994, Jamieson et al., 1996; Benetti et al., 2013; Zeng et al., 2019; capítulo III da presente tese). Porém, essa estrutura lamelar também está presente no Ocypodidae *O. ceratophthalmus*, espécie pertencente ao primeiro clado da filogenia (capítulo I), representando ser uma característica homoplásica em Thoracotremata. Na maioria dessas espécies, as lamelas concêntricas parecem preencher completamente a

região externa da zona acrossomal, com exceção os varunídeos *C. punctatus*, onde as lamelas estão presentes principalmente próximo à zona acrossomal periférica.

Em conclusão, os Varunidae e Grapsidae compartilham características comuns aos representantes de Thoracotremata, como espermatozoides esféricos ou elípticos, formados por um acrossoma com zonas acrossomais concêntricas, opérculo eletrodenso e núcleo preenchido por cromatina, com a presença dos braços radiais. Os varunídeos compartilham com Macrophtalmidae o opérculo não perfurado, ausência do botão apical, de aba periopercular e de anel opercular acessório. Como sinapomorfia de Varunidae está a cápsula do acrossomo, que se estende até a metade da câmara perforatorial. Por sua vez, todos os grapsídeos aqui estudados apresentam opérculo perfurado, botão apical e anel xantídeo modificado, as quais são sinapomorfias com Mictyridae e prováveis simplesiomorfias para os clados com ancestral comum aqui estudados e homoplásicos para Thoracotremata. Outra característica plesiomórfica são as lamelas concêntricas na zona acrossomal externa, a qual foi perdida nos varunídeos, *C. integer* e *Cyr. angulatus*. As principais sinapomorfias de Grapsidae são a aba periopercular, anel opercular acessório e ausência do anel espessado eletrodenso ou presente como estrutura menos eletrodensa, os quais parecem ser homoplásicas para Thoracotremata.

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(2), 361-370. <https://doi.org/10.1163/193724099X00178>
- Assugeni, C. de 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(12), 1628-1646. <https://doi.org/10.1002/jmor.20737>
- 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(11), 1312-1322. <https://doi.org/10.1002/jmor.20184>
- 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(1), 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>
- Clopton, R. E. (2004). Standard nomenclature and metrics of plane shapes for use in gregarine taxonomy. *Comparative Parasitology*, 71(2), 130-140. <https://doi.org/10.1654/4151>
- Davie, P. J., Guinot, D., & Ng, P. K. (2015). Systematics and classification of Brachyura. In *Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea, Volume 9 Part C* (2 vols) (pp. 1049-1130). Brill. https://doi.org/10.1163/9789004190832_021
- 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>
- Guinot, D. (1977). Propositions pour une nouvelle classification des Crustacés, Décapodes, Brachyours. *Comptes Rendus Hebdomaires des Seances de l'Academie des Sciences, Paris, serie D*, 285, 1049-1052.
- 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 of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 345(1314), 373-393. <https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0116>
- Jamieson, B. G., Guinot, D., & Forges, B. R. (1995). Phylogeny. of the Brachyura (Crustacea, Decapoda): Evidence from Spermatozoal Ultrastructure. *Advances in Spermatozoal Phylogeny and Taxonomy*, 166, 265-283.
- Jamieson, B. G. M., Guinot, D., & Forges, B. R. (1996). Contrasting spermatozoal ultrastructure in two thoracotreme crabs, *Cardisoma carnifex* (Gecarcinidae) and *Varununa litterata* (Grapsidae) (Crustacea: Brachyura). *Invertebrate Reproduction & Development*, 29(2), 111-126. <https://doi.org/10.1080/07924259.1996.9672503>
- Jamieson, B. G. M., & Tudge, C. C. (2000). Crustacea–Decapoda. In ‘Reproductive Biology of Invertebrates. Volume IX, Part C. Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny’. (Ed. BGM Jamieson.) pp. 1-95.
- Kitaura, J., Wada, K., & Nishida, M. (2002). Molecular Phylogeny of Grapsoid and Ocypodoid Crabs with Special Reference to the Genera *Metaplax* and *Macrophthalmus*. *Journal of Crustacean Biology*, 22(3), 682-693. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990281>
- Maddison, W. P. and D.R. Maddison. 2021. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.7.
- Montanaro, J., Gruber, D., & Leisch, N. (2016). Improved ultrastructure of marine invertebrates using non-toxic buffers. *PeerJ*, 4, e1860.
- Ng, P. K., Daniele Guinot, & Peter JF Davie. (2008). Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 17, 1-286.

- Ro, S., Talbot, P., Leung-Trujillo, J., & Lawrence, A. L. (1990). Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: segments 1–3. *Journal of Crustacean Biology*, 10(3), 455-468.
- 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>
- 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*, 269, 166-176. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2017.07.002>
- Tsang, L. M., Schubart, C. D., Ahyong, S. T., Lai, J. C. Y., Au, E. Y. C., Chan, T.-Y., Ng, P. K. L., & 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* (C. C. Tudge, Ed.; 1st Edition).
- Wang, Y. L., Sun, W. J., He, L., Li, Q., & Wang, Q. (2015). Morphological alterations of all stages of spermatogenesis and acrosome reaction in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Cell and Tissue Research*, 360, 401-412. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2092-5>
- Wolfe, J. M., Ballou, L., Luque, R., Watson-Zink, V. M., Ahyong, S. T., Barido-Sottani, J., Chan, T. Y., Chu, K. H., Crandall, K. A., Daniels, S. R., Felder, D. L., Mancke, H., Martin, J. W., Ng, P. K. L., Ortega-Hernández, J., Palacios Theil, E. N., Pentcheff, D., Robles, R., Thoma, B. P., Tsang, L. M., Wetzter, R., Windsor, A. M., Bracken-Grissom, H. D. (2022). Convergent adaptation of true crabs (Decapoda: Brachyura) to a gradient of terrestrial environments. *bioRxiv*, <https://doi.org/10.1101/2022.12.09.519815>.

- Yasuzumi, G. (1960). Spermatogenesis in Animals as Revealed by Electron Microscopy. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 7(1), 73-78. <https://doi.org/10.1083/jcb.7.1.73>
- Zeng, J., Peng, S., Zhong, S., & Zhang, H. (2019). The spermatozoal ultrastructure of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 7(4), 181. https://doi.org/10.4103/JMAU.JMAU_48_18

Capítulo VI

Ultraestrutura e filogenia molecular: história evolutiva dos espermatozoides em Thoracotremata (Decapoda: Brachyura)

Resumo

A ultraestrutura dos espermatozoides, em conjunto com análises filogenéticas moleculares podem ser ferramentas importantes para elucidar relações de parentesco e explorar a diversidade biológica em um contexto evolutivo. Neste capítulo, foi agrupado e identificado as características espermáticas ultraestruturais para entender a evolução destes caracteres nos Thoracotremata das superfamílias Pinnotheroidea, Grapsoidea e Ocypodoidea. A hipótese filogenética considerada foi descrita no capítulo I desta tese. Adicionalmente, foi construída uma matriz de caracteres espermáticos, as quais foram utilizadas para a reconstrução ancestral do caráter por parcimônia. Em geral, as espécies deste estudo apresentam características típicas observadas entre os Brachyura e Thoracotremata, incluindo espermatozoides esféricos ou elípticos, com vesícula acrossomal composta por diferentes zonas acrossomais concêntricas, opérculo eletrodenso e núcleo com braços radiais. Porém, a análise ultraestrutural dos espermatozoides de Thoracotremata do presente estudo, juntamente com os dados disponíveis na literatura científica, reconstruiu o estado de caráter ancestral comum deste grupo. Assim, foram identificadas as seguintes plesiomorfias espermáticas para o grupo: opérculo perfurado, botão apical, anel opercular acessório, aba periopercular, anel espessado eletrodenso e ausência de anel xantídeo modificado. Além disso, sinapomorfia para diferentes famílias, além de várias homologias foram descobertas e discutidas. Assim, este capítulo forma a linha de base para o conhecimento sobre a evolução dos espermatozoides em Thoracotremata, fornecendo importantes informações sobre as relações filogenéticas e os padrões morfológicos presentes nesse grupo e será crucial para futuros estudos ultraestruturais com espermatozoides de outras espécies de Thoracotremata.

Palavras-chave: caranguejos verdadeiros, filogenia, microscopia eletrônica de transmissão.

Introdução

O estudo da ultraestrutura dos espermatozoides tem se mostrado uma ferramenta útil para o entendimento das relações de parentesco entre grupos, além de permitir traçar a evolução desta célula germinativa. Em *Brachyura* Latreille, 1802, é recente a utilização da morfologia ultraestrutural do espermatozoide para inferências filogenéticas e verificar entendimento das relações evolutivas entre táxons (Jamieson, 1991, 1994; Jamieson & Tudge, 2000, Tudge, 2009). A ultraestrutura dos espermatozoides tem sido utilizada em conjunto com filogenias moleculares, como ferramenta essencial para apresentar alguns caracteres espermáticos que podem ser utilizados para buscar padrões de características morfológicas entre grandes grupos e famílias (Camargo et al., 2016, 2017; Assugeni et al., 2017; Garcia Bento et al., 2018). Isso permite determinar a história evolutiva e reconstruir o estado de caracter ancestral para estas células germinativas morfolologicamente ímpares entre os animais. Garcia Bento et al. (2018) utilizaram a ultraestrutura dos espermatozoides e dados moleculares de espécies de caranguejos primitivos, *Podotremata* Guinot, 1977, para entender as relações de parentesco em *Dromiidae* de Haan, 1833. Adicionalmente, Assugeni et al. (2017) utilizaram as mesmas ferramentas para investigar a ocorrência de determinadas características espermáticas entre caranguejos da família *Mithracidae* MacLeay, 1838 *Heterotremata* Guinot, 1977. Entre os *Thoracotremata*, até o momento nenhum trabalho utilizou a ultraestrutura dos espermatozoides e dados moleculares para verificar a existência de padrões filogenéticos entre as famílias, sendo que somente proposições cladísticas realizadas com a ultraestrutura dos espermatozoides foram levantadas (Jamieson, 1991, 1994).

Em geral, a ultraestrutura dos espermatozoides tem suportado a divisão tradicional dos caranguejos em *Podotremata*, *Heterotremata* e *Thoracotremata* Guinot, 1977, como verificado no estudo realizado por Jamieson (1994). *Podotremata*, agrupa espécies consideradas mais primitivas, com gonóporos que se abrem nas coxas do quinto e terceiro par de pereópodos em machos e fêmeas. Por sua vez, *Heterotremata* e *Thoracotremata*, fazem parte de *Eubrachyura* Saint Laurent, 1980, reunindo os “caranguejos verdadeiros”, com aberturas genitais esternais em ambos os sexos, sendo *Thoracotremata* o grupo mais derivado, caracterizado por possuir aberturas genitais (gonóporos) localizadas no sexto e oitavo esternito em fêmeas e machos, respetivamente (Guinot, 1977; Guinot et al., 2013; Tsang et al., 2014, 2022; Luque et al., 2019; Wang

et al. 2021).

Thoracotremata foi recentemente subdividida em cinco superfamílias: Aphanodactyloidea Ahyoung & Ng, 2009, Cryptochiroidea Paulson, 1875, Grapsoidea MacLeay, 1838, Ocypodoidea Rafinesque, 1815 e Pinnotheroidea De Haan, 1833 (Poore and Ahyoung, 2023). Embora Thoracotremata um grupo monofilético, existem divergências significativas no posicionamento das famílias dentro de suas superfamílias, principalmente, em relação à Grapsoidea e Ocypodoidea. Adicionalmente, em Pinnotheroidea, grande parte dos problemas envolvendo posicionamento de suas famílias ainda não foram resolvidos (Tsang et al., 2014, 2022; Wolfe et al., 2022, não revisado por pares; Kobayashi et al., 2023). Schubart et al. (2000) descreveram pela primeira vez que as subfamílias de Grapsidae eram polifiléticas. Posteriormente, suas subfamílias foram elevadas ao status de família, para colocá-las no mesmo nível taxonômico das famílias já reconhecidas, como Gecarcinidae MacLeay, 1838, Sesarmidae Dana, 1851, Varunidae H. Milne Edwards, 1853, Dotillidae Stimpson, 1858, Heloeciidae H. Milne Edwards, 1852, Mictyridae Dana, 1851, Macrophthalmidae Dana, 1851 e Ocypodidae Rafinesque, 1815. Em seguida, os "Grapsidae" e "Ocypodidae" foram elevados a superfamílias. Entretanto, estudos filogenéticos moleculares têm consistentemente questionado a validade dessas duas superfamílias por encontrarem polifilia entre representantes de suas famílias (Tsang et al., 2014, 2018; Chen et al., 2018; Ma et al., 2019; Sun et al., 2022; Wolfe et al., 2022, não revisado por pares). Adicionalmente, Ng et al. (2008) observaram que algumas associações nas árvores filogenéticas contradiziam os resultados de análises morfológicas, como a proximidade de *Mictyris* Latreille, 1806, Varunidae e *Macrophthalmus* Desmarest, 1823, que são morfológicamente diferentes (Kitaura et al., 2002; Schubart et al., 2006; Tsang et al., 2014). Desta forma, um estudo o qual utilize caracteres ultraestruturais do espermatozoide para o maior número de espécies de Thoracotremata, poderia agregar mais conhecimento e sanar lacunas envolvendo o posicionamento dos táxons do grupo.

Em termos ultraestruturais, os espermatozoides de caranguejos são imóveis e aflagelados, apresentam vesícula acrossomal esférica constituída por diferentes zonas ou camadas, comumente conhecidas por zona acrossomal interna, zona acrossomal externa, zona acrossomal raiada e zona acrossomal eletrolúcida (Jamieson, 1994; Jamieson et al., 1995; Jamieson & Tudge, 2000). Além disso, os espermatozoides contam com a câmara perforatorial contínua com a cápsula, que é uma invaginação do citoplasma subacrossomal. No ápice desta câmara, está a região subopercular e o opérculo, com

diferentes características ultraestruturais com valor taxonômico, constituindo o polo apical ou anterior. No outro polo, basal ou posterior, está o núcleo, geralmente preenchido com cromatina fibrosa, com ou sem braços nucleares ou radiais. Segundo a literatura, a maioria dos Thoracotremata compartilham os seguintes caracteres: zonação concêntrica do conteúdo acrossomal, ausência da zona acrossomal raiada, botão apical sobre a perfuração central do opérculo sobre a câmara perforatorial e anel opercular acessório (Jamieson & Tudge, 2000). Entretanto, existem várias divergências quanto à presença destes caracteres dentro das famílias, como por exemplo, a presença do botão apical em *Ocypode* Weber, 1795 e sua ausência em *Macrophthalmus*. Assim, um estudo ultraestrutural mais abrangente e detalhado poderia indicar se estas características são comuns ou não para as várias espécies dentro deste grupo (Jamieson et al., 1995) e associado com as filogenias moleculares, e mostrar como se deram os passos evolutivos para a evolução destas células dentro do contexto da diversidade biológica como já realizado em camarões Caridea e Penaeoidea (Braga et al., 2013; Camargo et al., 2016, 2017).

Em geral, os Pinnotheroidea são caranguejos de pequeno porte, encontrados em ambientes marinhos e estuarinos, habitando a cavidade paleal de moluscos, tubos de poliquetos, galerias de “corrupto” *Callichirus major* (Say, 1818) ou associados a equinodermos, dentre outros invertebrados (Castro, 2015; Tsang et al., 2022). Por sua vez, os Grapsoidea são animais semiterrestres que se adaptaram a uma variedade de ambientes, incluindo água salgada, salobra e doce. Alguns podem ser encontrados em praias rochosas e arenosas, enquanto outros preferem se abrigar em galerias na lama ou em raízes e troncos em regiões de estuários e manguezais (Melo, 1996; Guinot et al., 2018). Os Ocypodoidea habitam principalmente estuários em regiões tropicais e subtropicais, com algumas espécies endêmicas de áreas de manguezais e ilhas oceânicas. Outros são tradicionalmente encontrados em praias arenosas com seu deslocamento rápido, entrando e saindo das tocas. Esses caranguejos desenvolveram adaptações fisiológicas e comportamentais para garantir sua sobrevivência em ambientes úmidos e vegetados, como ilhas oceânicas e transições entre a mata atlântica e restingas, tais adaptações estão estritamente relacionadas à reprodução (Pinheiro et al., 2016).

Considerando o contexto apresentado, o objetivo deste estudo foi descrever caracteres espermáticos sinapomórficos e apomórficos de alguns representantes de Pinnotheridae, Gecarcinidae, Varunidae, Sesarmidae, Plagusiidae, Grapsidae e Ocypodidae, combinando com dados filogenéticos moleculares, a fim de entender a

evolução das características espermáticas em Thoracotremata, produzindo assim um estudo base para futuros estudos que envolvam caracteres ultraestruturais para o grupo e talvez para Decapoda. Além disso, buscou-se verificar a hipótese de que existam caracteres espermáticos exclusivos entre famílias em uma superfamília e espécies de uma mesma família.

Material e Métodos

1.1. Animais

Para as análises ultraestruturais, foram utilizados caracteres espermáticos de espécies descritas nos capítulos anteriores desta tese, tais como para os Pinnotheridae: *Austinixa patagoniensis* (Rathbun, 1918) e *Dissodactylus crinitichelis* Moreira, 1901, Ocypodidae: *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), *Minuca mordax* (Smith, 1870) e *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787), Varunidae: *Cyclograpsus integer* H. Milne Edwards, 1837, *Neohelice granulata* (Dana, 1851) e *Cyrtograpsus angulatus* Dana, 1851, Grapsidae: *Grapsus grapsus* (Linnaeus, 1758), *Pachygrapsus transversus* (Gibbes, 1850), *Pachygrapsus gracilis* (de Saussure, 1857), *Geograpsus lividus* (H. Milne Edwards, 1837) e *Goniopsis cruentata* (Latreille, 1803), Sesarmidae: *Armases angustipes* Dana, 1852, *Armases rubripes* (Rathbun, 1897), *Aratus pisonii* (H. Milne Edwards, 1837) e *Sesarma rectum* Randall, 1840, Gecarcinidae: *Cardisoma guanhumi* Latreille in Latreille, Le Peletier, Serville & Guérin, 1828 e *Johngarthia lagostoma* (H. Milne Edwards, 1837) e Plagusiidae: *Plagusia depressa* (Fabricius, 1775). Adicionalmente, foram também incluídos dados com descrições prévias encontradas na literatura científica, quando disponíveis ou perceptíveis nas imagens publicadas (Tabela 1).

Ultraestrutura dos espermatozoides

Os procedimentos ultraestruturais encontram-se especificados nos capítulos II a V desta tese. Resumidamente, as amostras do sistema reprodutor (n=5, mínimo) foram fixadas marPHEM (PHEM 1.5X + glutaraldeído 2.5% + sacarose) em água destilada (Montanaro et al., 2016) ou solução de Karnovsky (paraformaldeído 2% + glutaraldeído 2.5% em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH = 7.4) com ou sem sacarose 5%, por no mínimo 4 horas (Karnovsky, 1965, Ro et al., 1990; Garcia Bento et al., 2018). Após a pós fixação com tetróxido de ósmio 2%, no tampão de referência do fixador, as amostras

foram contrastadas com acetato de uranila aquoso a 1%, desidratadas em acetona e processada para rotina em resina Epon-Araldite. As grades foram observadas no microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM – 1010, acelerado a 80KV, no Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV, UNESP – Jaboticabal.

Análises filogenéticas e reconstrução dos estados ancestrais de caracteres

A árvore filogenética proposta no capítulo I foi utilizada para a reconstrução do estado ancestral em Thoracotremata. Para a matriz de caracteres, foram utilizados dados morfológicos da ultraestrutura dos espermatozoides descritos no presente estudo e aqueles disponíveis na literatura científica. Utilizando o método de parcimônia, os caracteres ultraestruturais que se mostraram robustos para separar grupos intimamente relacionados, foram codificados e rastreados na árvore. Para isto, utilizou-se o software Mesquite V3.7 (Maddison & Maddison, 2021). Para designar o estado do caractere, foram atribuídos números, a saber: Caráter 1 “Opérculo” - Imperfurado (0), Perfurado (1); Caráter 2 “Botão apical” - Ausente (0), Presente (1); Caráter 3 - “Anel opercular acessório” - Ausente (0), Presente (1); Caráter 4 – Anel espessado – Ausente (0), Presente (1); Caráter 6 “Morfologia do anel espessado” – Eletrodenso (0), Menos eletrodenso (1). Para as espécies com dados insuficientes, o status atribuído foi o símbolo “?”.

Resultados

Morfologia geral dos espermatozoides em Thoracotremata

Os espermatozoides dos Thoracotremata são constituídos por vesícula acrossomal, formada por um opérculo perfurado, com exceção de *U. cordatus* e os Varunidae. O botão apical, sobre o opérculo no polo anterior ou apical do espermatozoide, é uma característica compartilhada entre todas as famílias analisadas, exceto os Varunidae, e mais uma vez o Ocypodidae *U. cordatus*. Adicionalmente, caracteres como anel opercular acessório e aba periopercular foram comuns para a maioria dos Thoracotremata, sendo a ausência destas estruturas uma sinapomorfia para Varunidae e Sesarmidae. A vesícula acrossomal foi formada por três ou quatro zonas ou camadas concêntricas e entre as zonas, algumas espécies exibem o anel xantídeo modificado. A cápsula do acrossoma em geral, ocorre sobre o opérculo e botão apical, e inicia-se internamente ao espermatozoide nas margens operculares, terminando na região anterior

do anel espessado eletrodenso, onde este espaço desaparece e a membrana da cápsula permanece contínua a membrana da câmara perforatorial. Porém, em Pinnotheridae e Varunidae a cápsula progride além da região anterior do anel espessado, alcançando a região média da câmara perforatorial, sendo uma sinapomorfia para Varunidae, mas uma homoplasia entre os Thoracotremata. O anel espessado eletrodenso está ausente em Grapsidae, sendo a sinapomorfia principal da família (Esquema 1).

Variações dos caracteres espermáticos entre as famílias

Família Pinnotheridae

Em Pinnotheridae, os espermatozoides das espécies *A. patagoniensis* e *D. crinitichelis* apresentam vesícula acrossomal formada por um opérculo perfurado que, em conjunto com a região central da vesícula acrossomal, se estendem anteriormente ultrapassando a altura das margens laterais do acrossomo. Devido à essa extensão, o ápice da vesícula acrossomal forma figura semelhante à um triângulo (Fig. 2A e B). Na região anterior do espermatozoide, observa-se o material supraopercular e o botão apical com formato triangular (Fig. 2A – D). A aba periopercular eletrolúcida é observada nas margens laterais do opérculo e o curto anel opercular acessório, exibe morfologia trilaminar. No ápice da câmara perforatorial, junto ao material subopercular, observa-se uma área (anel) menos eletrodensa, próximo a unidade de membrana da câmara (Fig. 2A – D). A base da curta câmara perforatorial é marcada pelo anel espessado eletrodenso e floculado (Fig. 2E). O acrossoma possui três zonas acrossomais, a zona acrossomal interna, a intermediária e a externa e a cápsula do acrossomo se estende além das margens anteriores do anel espessado (Fig. 2F e G).

Família Ocypodidae

Nos ocipodídeos estudados, a região central do ápice acrossomal ultrapassa ligeiramente as margens laterais da vesícula acrossomal, e apesar de não terem sido observados em *U. cordatus*, o opérculo eletrodenso perfurado, o botão apical e um curto anel opercular acessório trilaminar são encontrados em *M. mordax* e *O. quadrata* (Fig. 3A – E). O botão apical é relativamente pequeno e esférico (Fig. 3D e E). A aba periopercular eletrolúcida está presente próxima às margens laterais do opérculo (Fig. 3E e F), e a cápsula acrossomal eletrolúcida, termina na região anterior do anel espessado floculado e eletrodenso (Fig. 3F – H). Em geral, o acrossomo é constituído por três zonas acrossomais (interna, externa e periférica), com exceção à *U. cordatus*, que além das

zonas interna, externa e periférica, mostrou a presença da zona acrossomal intermediária, sendo a interna raiada. O anel xantídeo modificado é característica compartilhada entre os ocipodídeos, sendo ausente no caranguejo violinista *M. mordax* (Fig. 3F – H).

Família Varunidae

Os espermatozoides dos Varunidae *C. integer*, *Cyr. angulatus* e *N. granulata* possuem vesícula acrossomal composta por um opérculo não perfurado, com delgada camada eletrodensa, onde deveria ocorrer a perfuração. Adicionalmente, todos compartilham a ausência de botão apical, anel opercular acessório, aba periopercular e anel xantídeo modificado (Fig. 4A – I). A cápsula acrossomal termina na altura da metade da câmara perforatorial e junto à cápsula observa-se o anel espessado eletrodense. O acrossoma é constituído por três zonas acrossomais, a zona acrossomal interna, a externa e a periférica (Fig. 4G- I).

Família Grapsidae

Nos grapsídeos estudados, observa-se vesícula acrossomal quase esférica, com região apical constituída por um opérculo centralmente perfurado e botão apical eletrodense e esférico (Fig. 5A – G). Adicionalmente, seus representantes possuem aba periopercular eletrolúcida, que é completamente envolvida pelo opérculo, como observado em *G. grapsus*, *P. transversus* e *P. gracilis* (Fig. 5A – C), ou quase totalmente recoberta pelo opérculo, em *Ge. lividus* e *Go. cruentata* (Fig. 5D e E). Em todas as espécies, o anel opercular acessório trilaminar é levemente curvado (Fig. 5F, G, I, J). Exclusivamente nas espécies desta família, o anel espessado é ausente ou este está presente como material menos eletrodense quando comparados as demais espécies de Brachyura (Fig. 5H). A cápsula acrossomal termina na região anterior onde deveria ocorrer o anel ou está o anel espessado pouco eletrodense. A vesícula acrossomal exhibe três zonas acrossomais (interna, externa e periférica) e o anel xantídeo modificado, que ocorre a partir da região anterior da base da câmara perforatorial, partindo do material menos eletrodense onde estaria o anel espessado (Fig. 5I e J).

Família Sesarmidae

Os espermatozoides exibem vesícula acrossomal com opérculo perfurado e um pequeno botão apical (Fig. 6A – D). Em geral, o botão apical é esférico, com exceção à *S. rectum*, no qual esta estrutura tem formato triangular (Fig. 6E e F). Em todas as espécies estudadas, a aba periopercular, o anel opercular acessório e o anel xantídeo modificado

estão ausentes. Além disso, foi observada a presença da cápsula acrossomal eletrolúcida, terminando na região anterior do anel espessado (Fig. 6A – D). Este anel é eletrodenso e floculado (Fig. 6G). O acrossomo é formado por três zonas acrossomais: interna, externa e periférica (Fig. 6H e I).

Família Gecarcinidae

Os Gecarcinidae possuem acrossomo com opérculo centralmente perfurado, com margens centrais estendidas para o polo mais anterior acompanhando a vesícula acrossomal, tornando-se salientes ao espermatozoide. No ápice da vesícula acrossomal são observados o botão apical, aba periopercular, localizada nas margens laterais operculares e anel opercular acessório trilaminar (Fig. 7A – D). A cápsula acrossomal se estende até a região anterior do anel espessado (Fig. 7A e B). Este anel é eletrodenso e floculado (Fig. 7E e F). A vesícula acrossomal é formada por quatro zonas acrossomais (interna, intermediária, externa e periférica), com a externa exibindo lamelas concêntricas (Fig. 7G e H). O anel xantídeo modificado é comum aos gecarcinídeos estudados, sendo que em *Ca. guanhumi*, esta estrutura mostra-se eletrodensa e bastante espessa no polo basal, tornando-se progressivamente mais delgada anteriormente. Por sua vez, em *J. lagostoma*, o anel xantídeo é delgado, homogêneo, curvo, com forma meia-lua, tornando-se ainda mais delgado no ápice (Fig. 7G e H).

Família Plagusiidae

Plagusia depressa apresenta espermatozoides com vesícula acrossomal formada por opérculo centralmente perfurado e botão apical com formato triangular, que se projeta anteriormente para além da vesícula acrossomal (Fig. 8A). O anel opercular acessório é trilaminar longo e curvado e a aba periopercular encontra-se ausente (Fig. 8A e B). A cápsula acrossomal termina na região anterior do anel espessado eletrodenso e floculado (Fig. 8A, C). Neste plagusídeo, a vesícula acrossomal está formada por quatro zonas acrossomais: interna, intermediária, externa e periférica (Fig. 8C e D). Adicionalmente, esta espécie também merece destaque por apresentar a zona acrossomal interna raiada, com raios em direção à zona acrossomal intermediária e anel espessado eletrodenso e floculado (Fig. 8E e F).

Reconstrução de estado ancestral de caráter

Com o mapeamento dos caracteres espermáticos ultraestruturais das famílias de Thoracotremata utilizadas na filogenia produzida no capítulo I da presente tese, observa-se que o ancestral comum ao grupo possuía: opérculo perfurado (Fig. 9), botão apical (Fig. 10), anel opercular acessório (Fig. 11), aba periopercular (Fig. 12), anel espessado (Fig. 13) eletrodenso (Fig. 13) e ausência de anel xantídeo modificado (Fig. 14).

Tabela, figuras e legendas

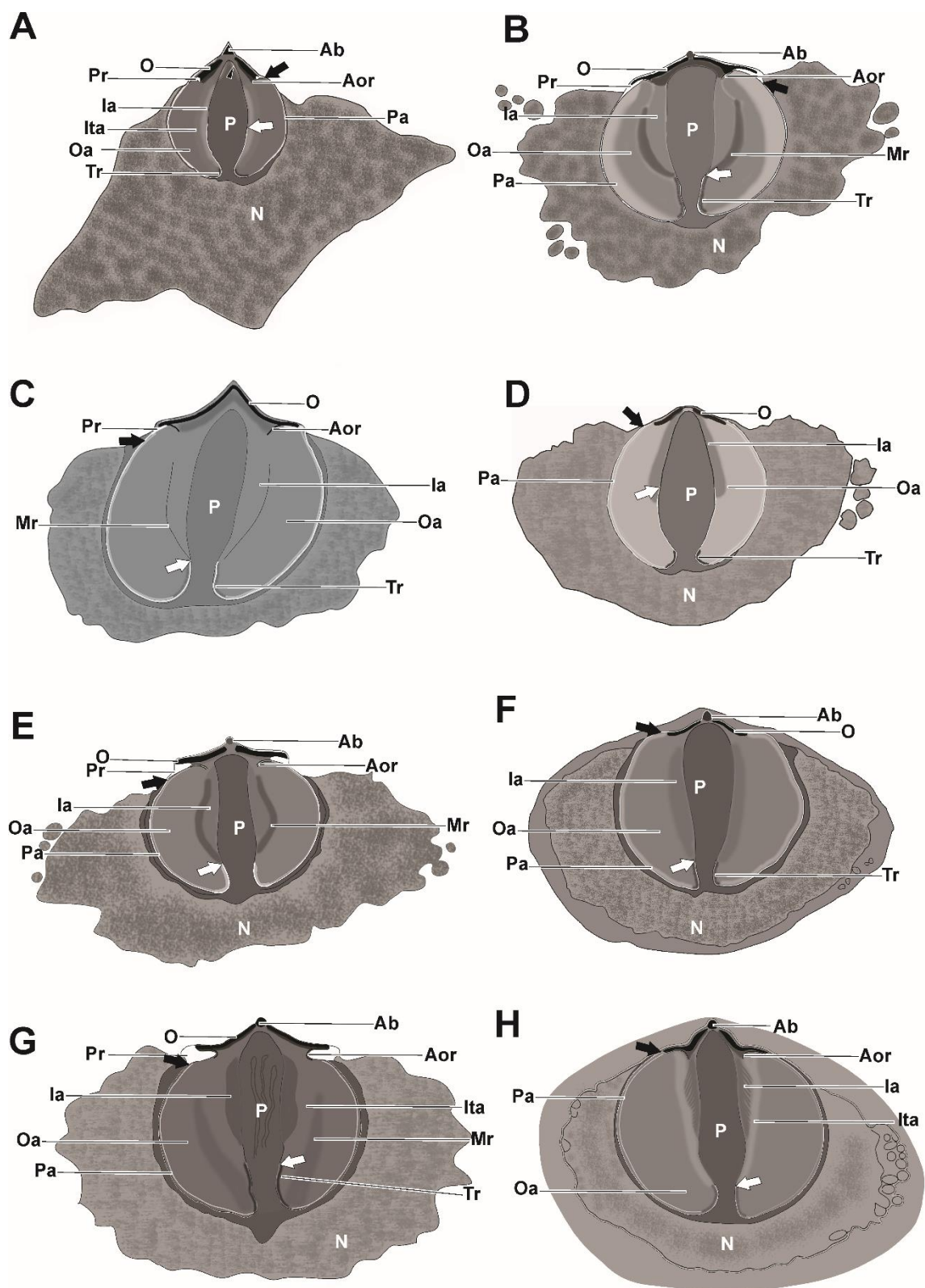
Tabela 1. Espécies de Thoracotremata com a ultraestrutura dos espermatozoides descritas.

Superfamília e Família	Espécie	Referência
Grapsoidea		
Gecarcinidae	<i>Cardisoma carnifex</i> (Herbst, 1796)	Jamieson et al., 1996
Grapsidae	<i>Cardisoma guanhumi</i>	Benetti et al., 2013
	<i>Geograpsus lividus</i>	Tiseo et al., 2017
	<i>Grapsus albolineatus</i> Latreille in Milbert, 1812	Jamieson, 1991
	<i>Pachygrapsus gracilis</i>	Tiseo et al., 2017
	<i>Pachygrapsus transversus</i>	Tiseo et al., 2017
	<i>Metopograpsus messor</i>	Anilkumar et al., 1999
Sesarmidae	<i>Armases cinereum</i> (Bosc, 1801)	Jamieson & Tudge, 2000 (como <i>Sesarma cinereum</i>)
	<i>Sesarma reticulatum</i> (Say, 1817)	Jamieson & Tudge, 2000
	<i>Parasesarma catenatum</i> (Ortmann, 1897)	Jamieson & Tudge, 2000 (como <i>Sesarma catenata</i>)
	<i>Parasesarma erythrodatyla</i> (Hess, 1865)	Jamieson, 1991 (como <i>Sesarma erythrodatyla</i>)
Varunidae	<i>Cyclograpsus punctatus</i> H. Milne Edwards, 1837	Jamieson & Tudge, 2000
	<i>Eriocheir japonica</i> (de Haan, 1835)	Yasuzumi, 1960 (como <i>E. japonicus</i>)
	<i>Eriocheir sinensis</i> H. Milne Edwards, 1853	Zeng et al. 2019
	<i>Varuna litterata</i> (Fabricius, 1798)	Jamieson et al., 1996
Ocypodoidea		
Ocypodidae	<i>Afruca tangeri</i> (Eydoux, 1835)	Medina, 1992; Medina & Rodriguez, 1992
	<i>Macrophthalmus (macrophthalmus)</i> H. Milne Edwards, 1852	Jamieson, 1991, 1994
	<i>crassipes</i>	
	<i>Mictyris longicarpus</i> Latreille, 1806	Jamieson, 1991, 1994
	<i>Ocypode ceratophthalmus</i> (Pallas, 1772)	Jamieson, 1991, 1994 (como <i>Ocypode ceratophthalma</i>)
	<i>Ocypode quadrata</i>	Matos et al., 2001

Continuação na próxima página

Pinnotheroidea Pinnotheridae	<i>Leptuca thayeri</i> (Rathbun, 1900)	Benetti et al., 2008 (como <i>Uca thayeri</i>)
	<i>Minuca vocator</i> (Herbst, 1804)	Benetti et al., 2008 (como <i>Uca vocator</i>)
	<i>Tubuca dussumieri</i> (H. Milne Edwards, 1852)	Jamieson, 1991, 1994 (como <i>Uca dussumieri</i>)
	<i>Uca maracoani</i> (Latreille, 1803)	Benetti et al., 2008
	<i>Ucides cordatus</i>	Matos et al., 2000
	<i>Nepinnotheres pinnotheres</i> (Linnaeus, 1758)	Becker et al., 2013
	<i>Pinnixa</i> White, 1846 sp.	Reger, 1970
	<i>Pinnotheres pisum</i> (Linnaeus, 1767)	Becker et al., 2013

Esquema



Esquema 1. Diagramas ultraestruturais dos espermatozoides nas famílias de Thoracotremata. A= Pinnotheridae; B= Ocypodidae (Gelasiminae Miers, 1886 e Ocypodinae Rafinesque, 1815); C= Ocypodidae (Ucinae Dana, 1851); D= Varunidae; E= Grapsidae; F= Sesarmidae; G= Gecarcinidae; H= Plagusiidae. Ab= Botão apical, Aor= anel opercular acessório; Cabeça de seta= Anel apical eletrolúcido da câmara perforatorial; Ia= zona acrossomal interna; Ita= zona acrossomal intermediária; Mr= anel xantídeo modificado; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Pr= aba periopercular; Seta preta= início da cápsula acrossomal; Seta branca= limite final da cápsula acrossomal; Tr= anel espessado;

Figura 2

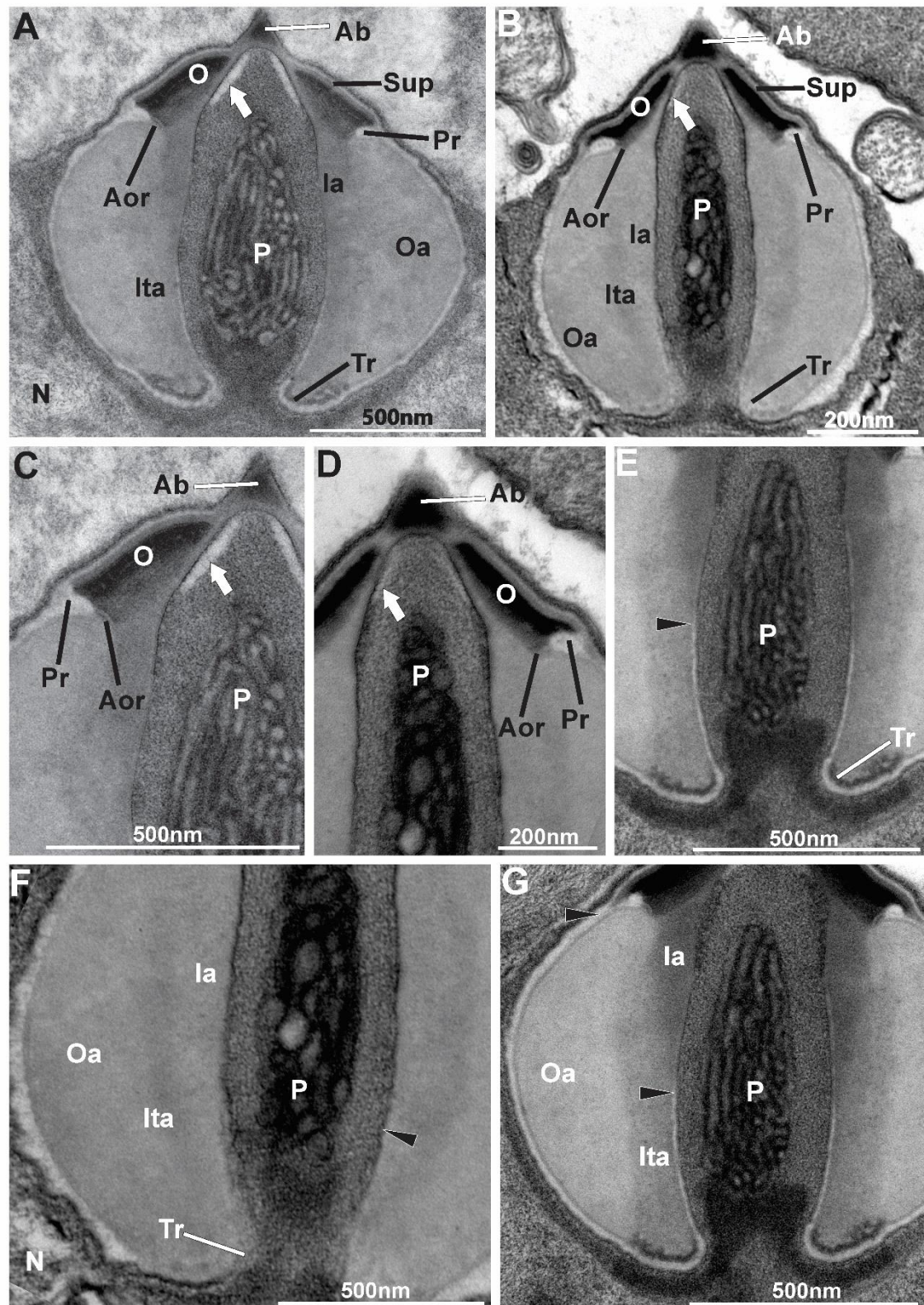


Figura 2. Microscopia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de Pinnotheridae. A, C, E, G= *Austinixa patagoniensis*; B, D e F= *Dissodactylus crinitichelis*. **A e B.** Aspecto geral dos espermatozoides. Seta branca= anel apical eletrolúcido da câmara perforatorial. **C e D.** Detalhe do ápice espermático. Note o opérculo perfurado e a presença do botão apical triangular, curto anel opercular acessório e aba periopercular. **E.** Detalhe do anel espessado eletrodenso e floculado. Cabeça de seta= cápsula acrossomal; **F e G.** Detalhe da vesícula acrossomal, formada pelas zonas acrossomais interna e externa. Cabeça de seta= cápsula acrossomal; Ab= botão apical; Aor= anel opercular acessório; Ia= zona acrossomal interna; Ita= zona acrossomal intermediária; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pr= aba periopercular; Sup= material supraopercular; Tr= anel espessado.

Figura 3

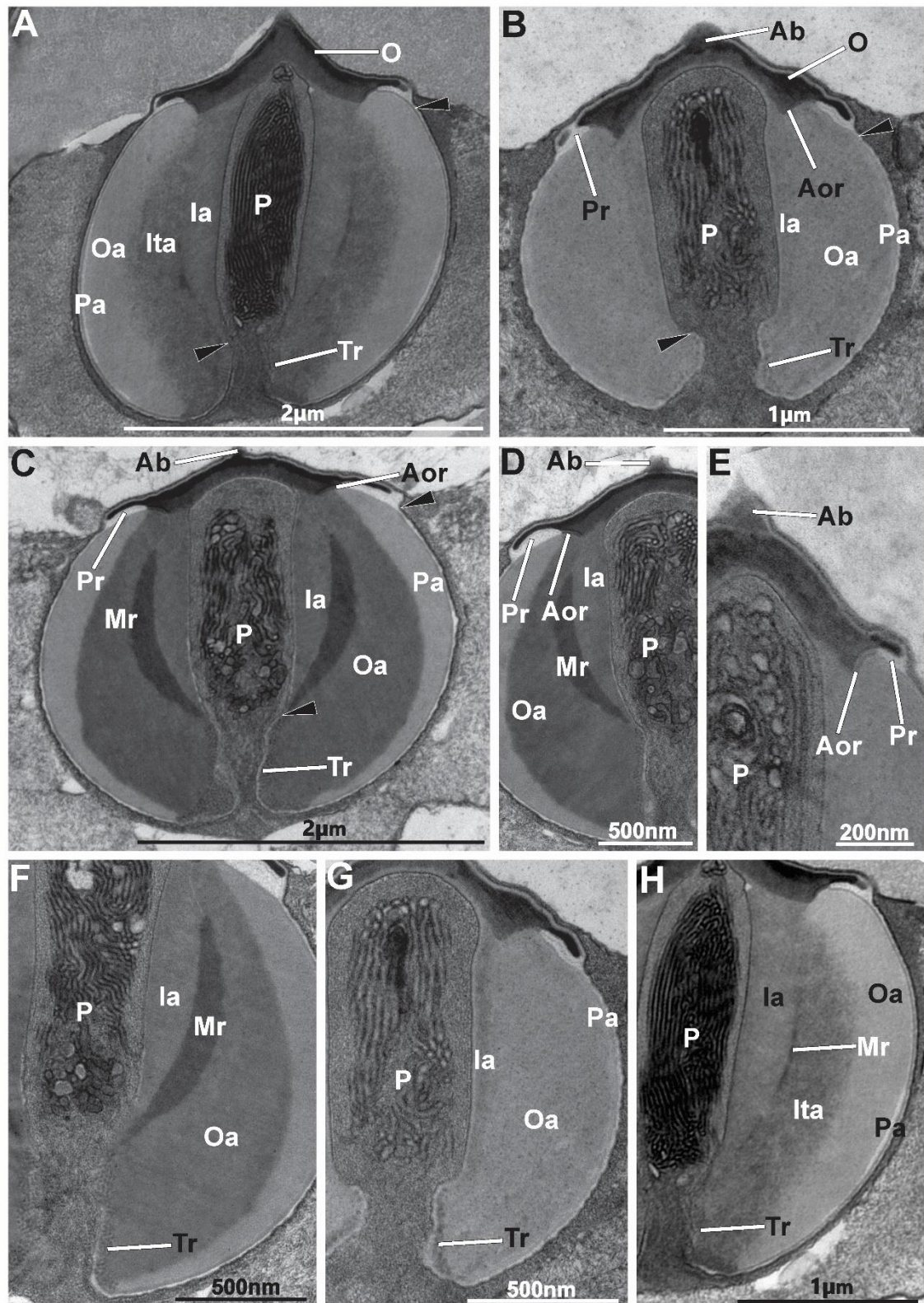


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão dos espermatozoides de Ocypodidae. *A e H= Ucides cordatus*, *B, E, G= Minuca mordax*, *C, D e F=Ocypode quadrata*. **A, B e C.** Vista geral dos espermatozoides de Ocypodidae. **D e E.** Ápice da vesícula acrossomal. Note o botão apical, o anel opercular acessório e a aba periopercular. **F.** Acrossomo de *O. quadrata* formado pela zona acrossomal interna, externa e periférica. Observe o anel xantídeo modificado e o anel espessado eletrodenso e floculado. **G.** Anel xantídeo modificado ausente. **H.** Anel xantídeo modificado entre as zonas acrossomais interna e intermediária. Ab= botão apical; Aor= anel opercular acessório; Ia= zona acrossomal interna; Ita= zona acrossomal intermediária; Mr= anel xantídeo modificado; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Pr= aba periopercular; Tr= anel espessado.

Figura 4

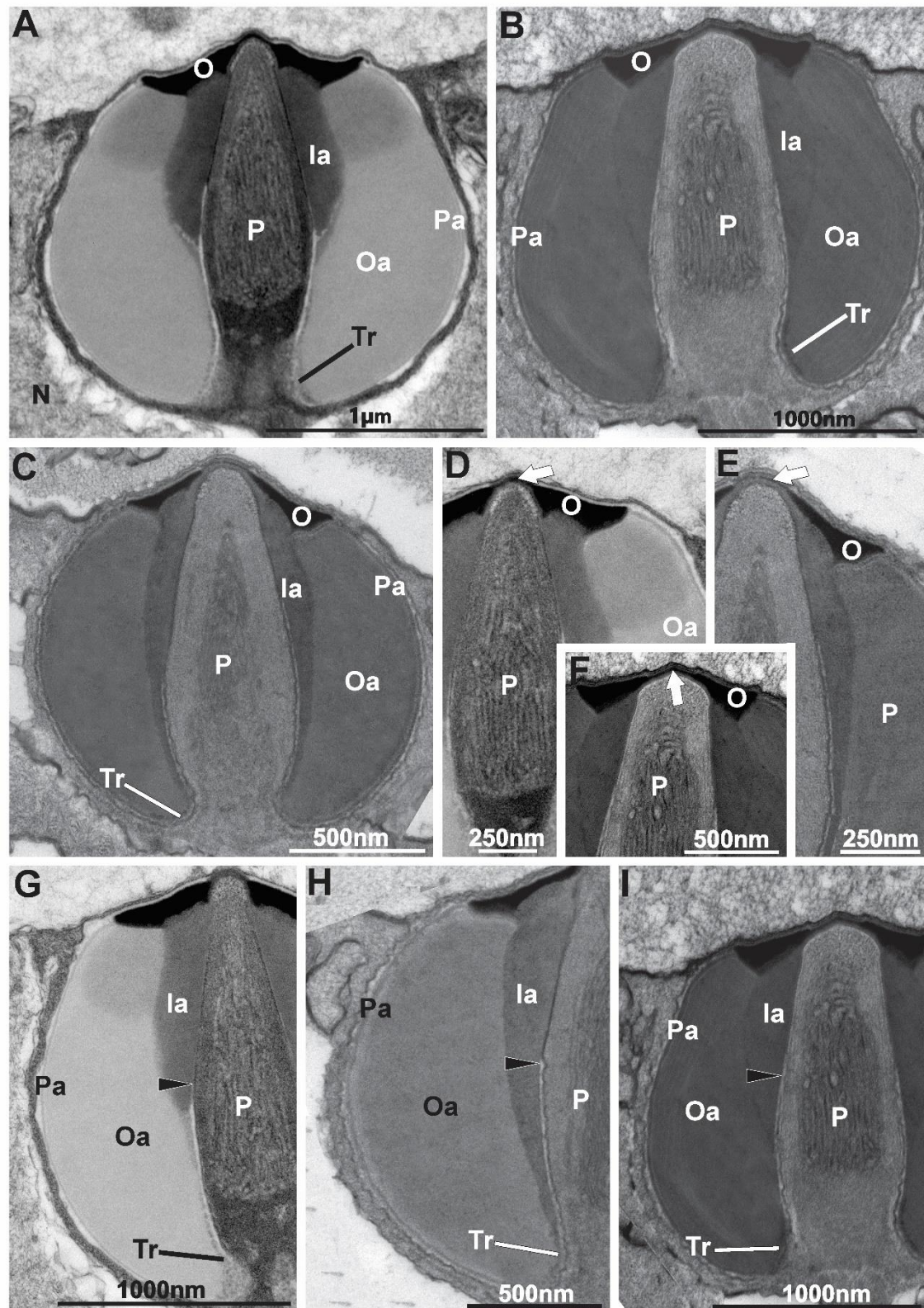


Figura 4. Ultraestrutura dos espermatozoides de Varunidae. *A, D, G= Cyclograpsus integer*; *B, F e I= Neohelice granulata*; *C, E e H= Cyrtograpsus angulatus*. **A, B e C.** Aspecto geral dos espermatozoides. **D, E e F.** Detalhe do ápice da vesícula acrossomal. Note o opérculo não perfurado pela presença de delgada camada eletrodensa na região que estaria a perfuração (setas brancas), além da ausência de botão apical, anel periopercular acessório e aba periopercular. **G, H e I,** Vesícula acrossomal exibindo as zonas acrossomais interna, externa e periférica. Observe que a cápsula se estende até a altura da metade da câmara perforatorial (cabeça de seta) e a presença do anel espessado eletrodense e floculado. Ia= zona acrossomal interna; N= núcleo; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Tr= anel espessado.

Figura 5

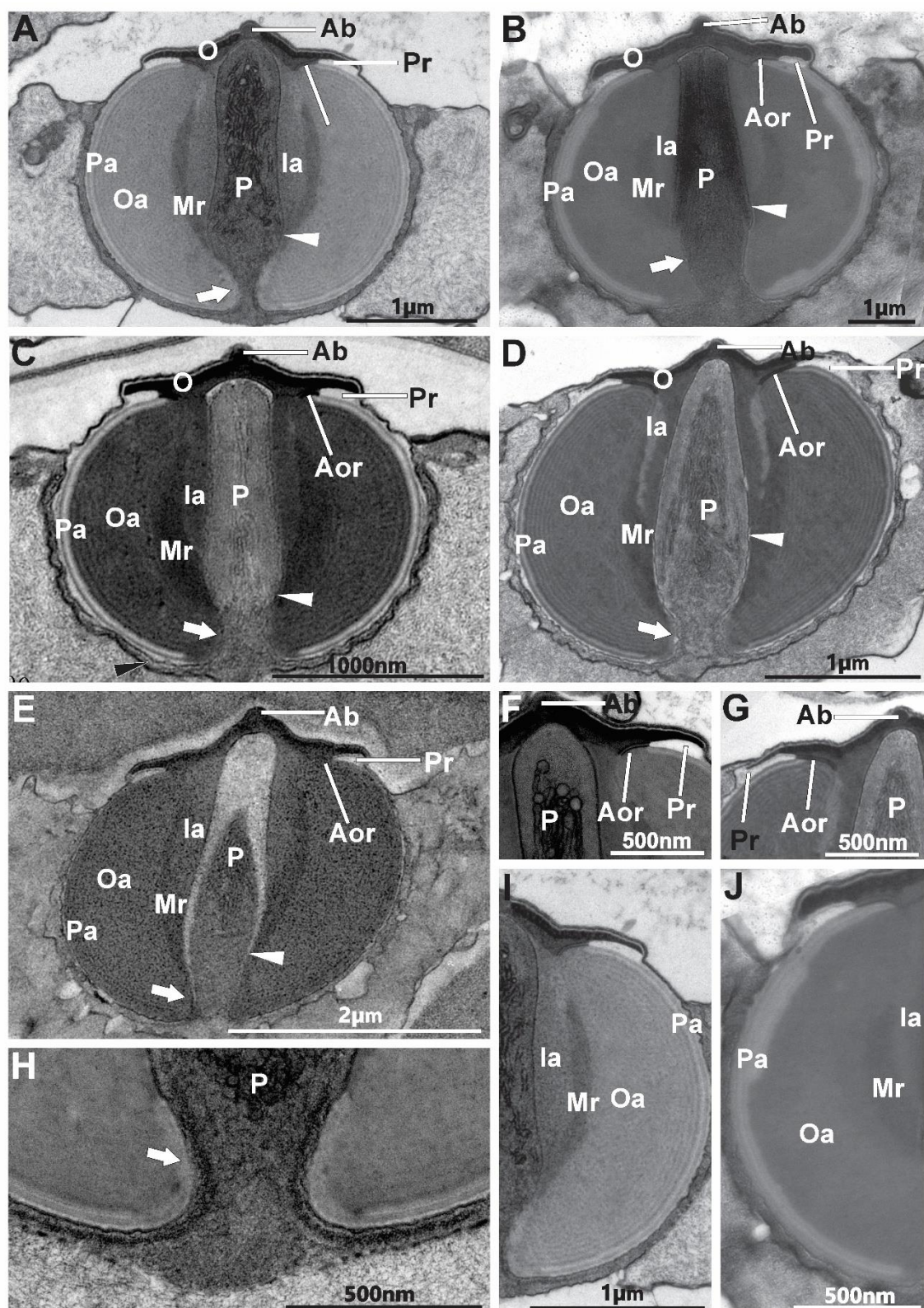


Figura 5. Espermatozoides de Grapsidae. *A, F, H e I*= *Grapsus grapsus*, *B e J*= *Pachygrapsus transversus*, *C*= *P. gracilis*; *D e G*= *Geograpsus lividus*; *E*= *Goniopsis cruentata*. **A – E.** Vista geral dos espermatozoides. Note a cápsula se estendendo pouco além da constrição da câmara perforatorial (cabeças de setas) e a ausência do anel espessado com configuração típica (setas). **F e G.** Ápice da vesícula acrossomal. Observe o botão apical, anel opercular acessório e aba periopercular; **H.** Anel espessado menos eletrodenso que as demais zonas acrossomais. **I e J.** Detalhe das zonas acrossomais interna, externa e periférica. Note ainda o anel xantídeo modificado entre as zonas interna e externa. Ab= botão apical; Aor= anel opercular acessório; Ia= zona acrossomal interna; Mr= anel xantídeo modificado; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Pr= aba periopercular.

Figura 6

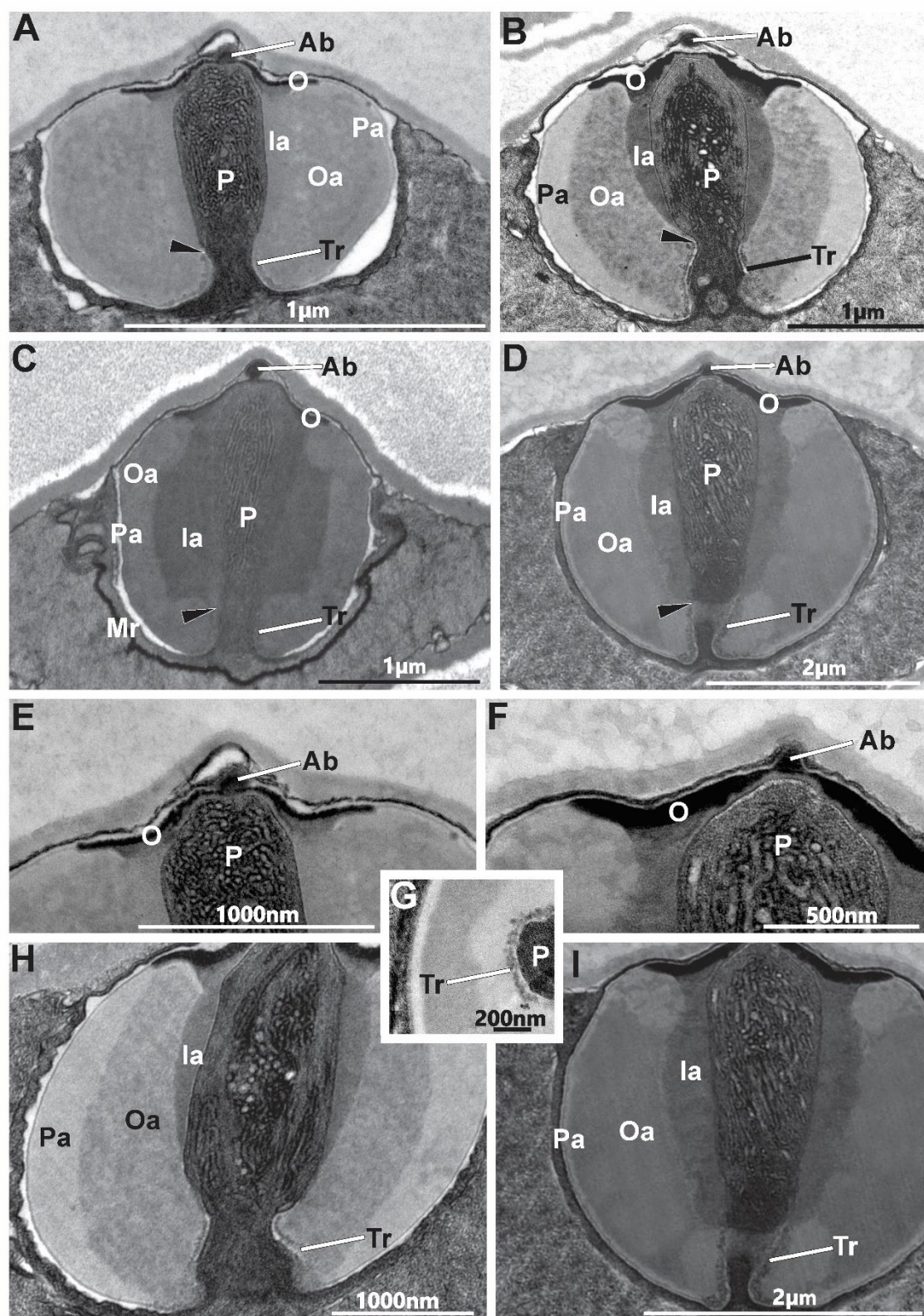


Figura 6. Ultraestrutura dos espermatozoides de Sesarmidae. *A e E= Aratus pisonii*, *B e H= Armases angustipes*, *C= Ar. rubripes*; *D, F, G e I= S. rectum*. **A – D.** Aspecto geral dos espermatozoides, mostrando as zonas acrossomais, câmara perforatorial, opérculo e botão apical. A cápsula acrossomal termina na região de constrição da câmara perforatorial. **E e F.** Detalhe do ápice da vesícula acrossomal. Note o botão apical que arredondado em todos os sesarmídeos, exceto em *S. rectum* (**D**), onde esta estrutura é triangular. Observe ainda que nas espécies desta família, o anel opercular acessório e a aba periopercular encontram-se ausentes. **G.** Detalhe do anel espessado eletrodenso e floculado comum a todos os representantes da família. **H e I.** Vesícula acrossomal formada pelas zonas acrossomais interna, externa e periférica. Note ainda que neste grupo, o anel xantídeo modificado é ausente. Ab= botão apical; Ia= zona acrossomal interna; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Tr= anel espessado.

Figura 7

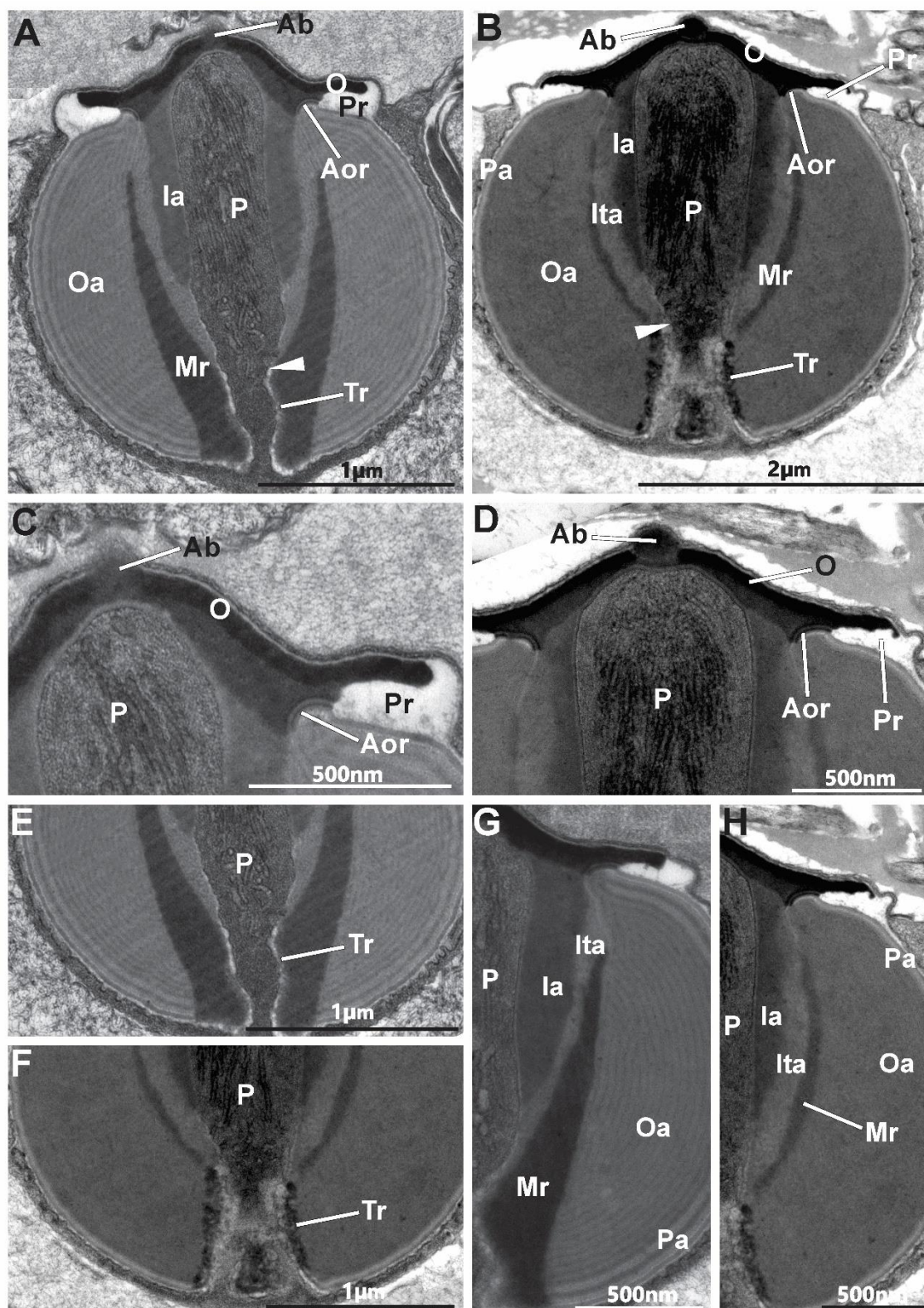


Figura 7. Espermatozoides de Gecarcinidae. A, C, E, G= *Cardisoma guanhumi*, B, D, F e H= *Johngarthia lagostoma*. **A e B.** Aspecto geral dos espermatozoides, mostrando opérculo, câmara perforatorial, as zonas acrossomais e o anel xantídeo modificado. Observe que a cápsula termina após o terço inicial da câmara perforatorial. Cabeça de seta= Cápsula do acrossomo. **E e D.** Ápice do acrossomo. Note que os representantes desta família apresentam botão apical, anel opercular acessório, aba periopercular e anel xantídeo modificado; **E e F.** Detalhe da base da vesícula acrossomal. Ambos gecarcinídeos possuem anel espessado. **G e H.** Detalhe das zonas acrossomais interna, intermediária, externa e periférica. Note ainda o anel xantídeo modificado. Ab= botão apical; Aor= anel opercular acessório; Ia= zona acrossomal interna; Ita= zona acrossomal intermediária; Mr= anel xantídeo modificado; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Pr= aba periopercular; Tr= anel espessado.

Figura 8

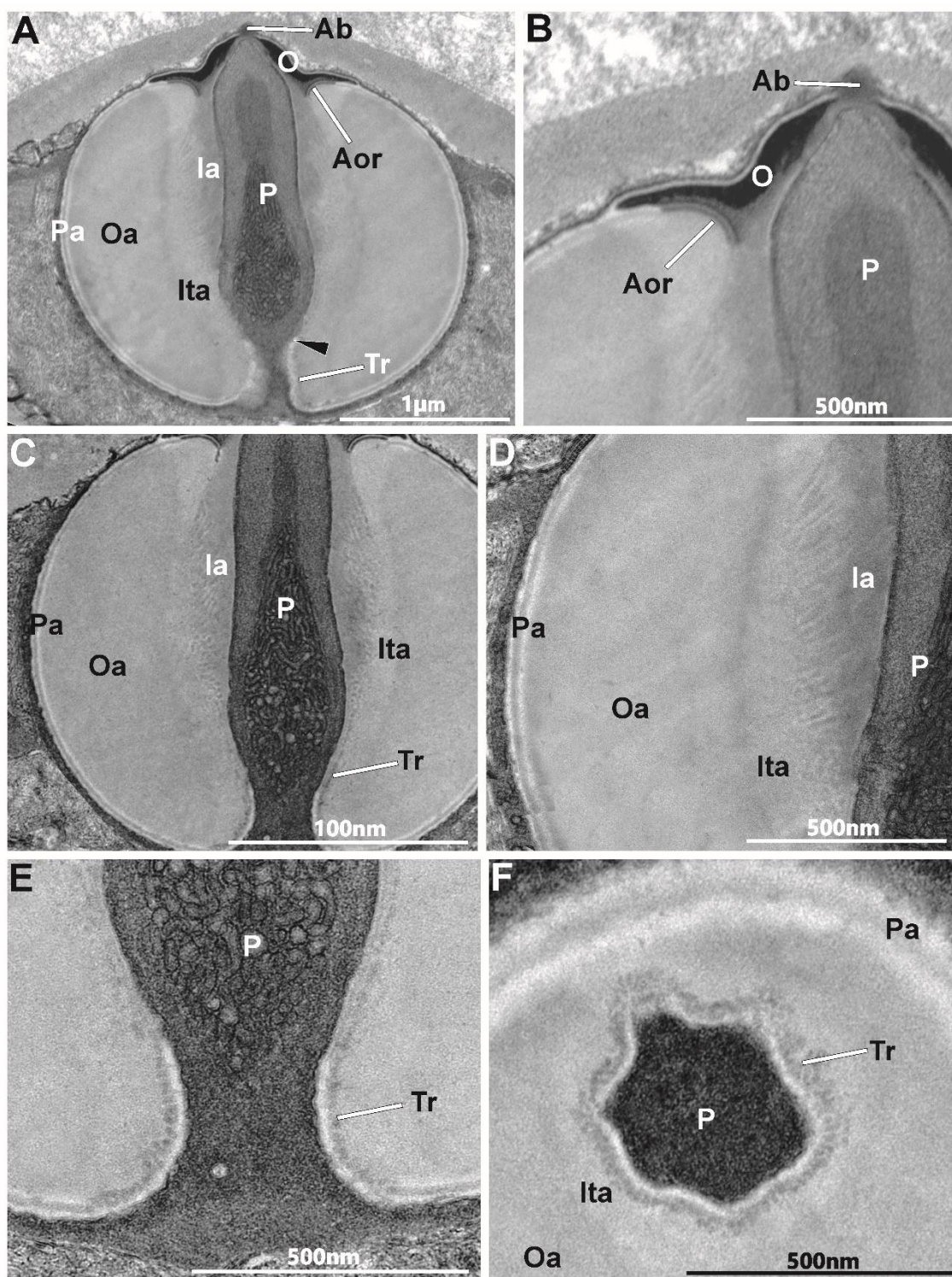


Figura 8. Espermatozoides do Plagusiidae *Pl. depressa*. **A.** Aspecto geral dos espermatozoides. **B.** Detalhe do ápice da vesícula acrossomal, exibindo o botão apical e o anel opercular acessório. **C e D.** Vesícula acrossomal. Observe as zonas acrossomais interna, externa e periférica e o anel xantídeo modificado. **E.** Anel espessado eletrodenso e floculado. **F.** Corte transversal do espermatozoide. Note o anel espessado e as zonas acrossomais. Ab= botão apical; Aor= anel opercular acessório; Ia= zona acrossomal interna; Ita= zona acrossomal intermediária; O= opérculo; Oa= zona acrossomal externa; P= câmara perforatorial; Pa= zona acrossomal periférica; Tr= anel espessado.

Figura 9

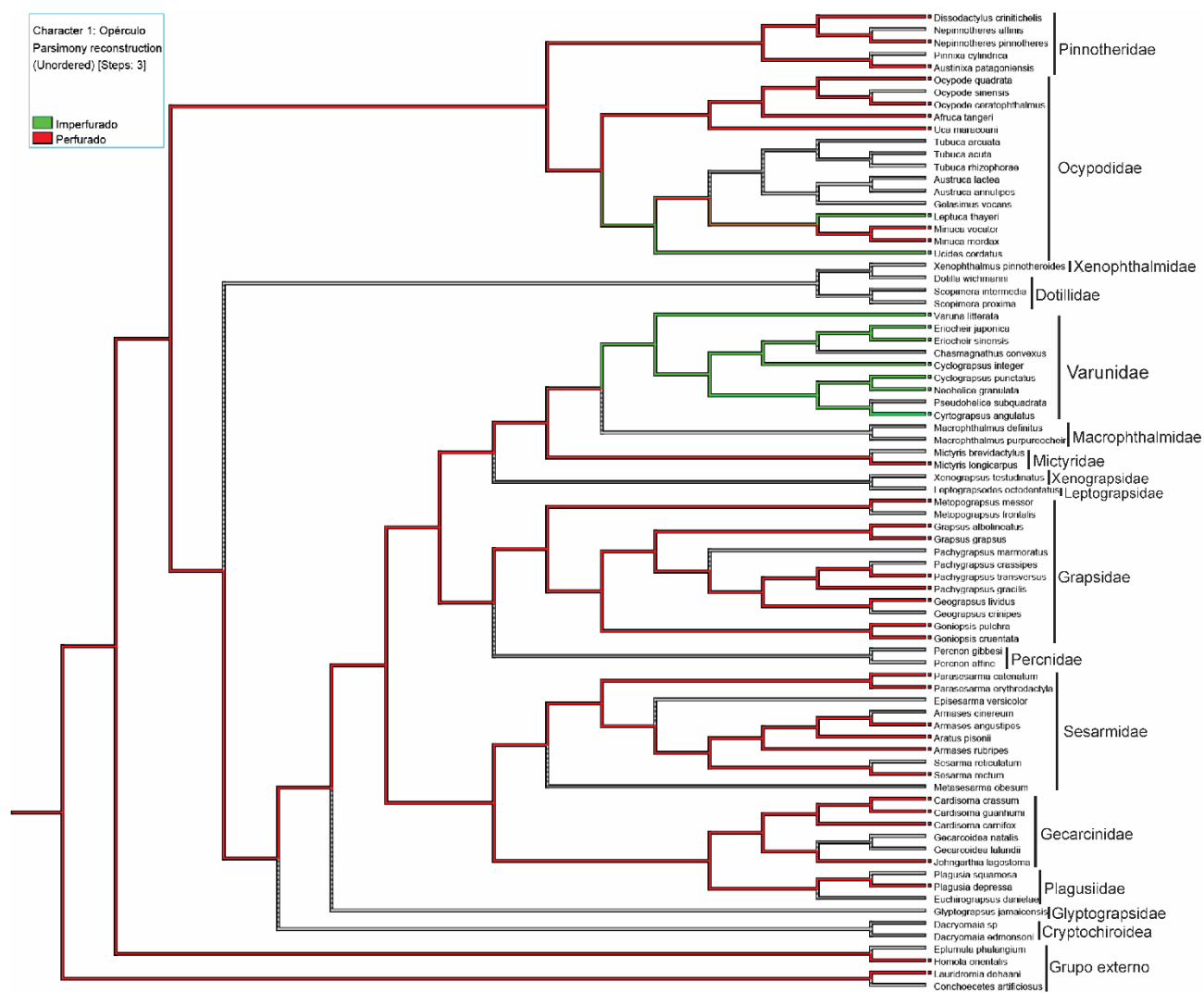


Figura 9. Mapeamento do caráter “Opérculo”. Note em vermelho que o opérculo perfurado é plesiomorfia de Thoracotremata e em verde, as espécies ou famílias em que há a presença de um opérculo contínuo.

Figura 10

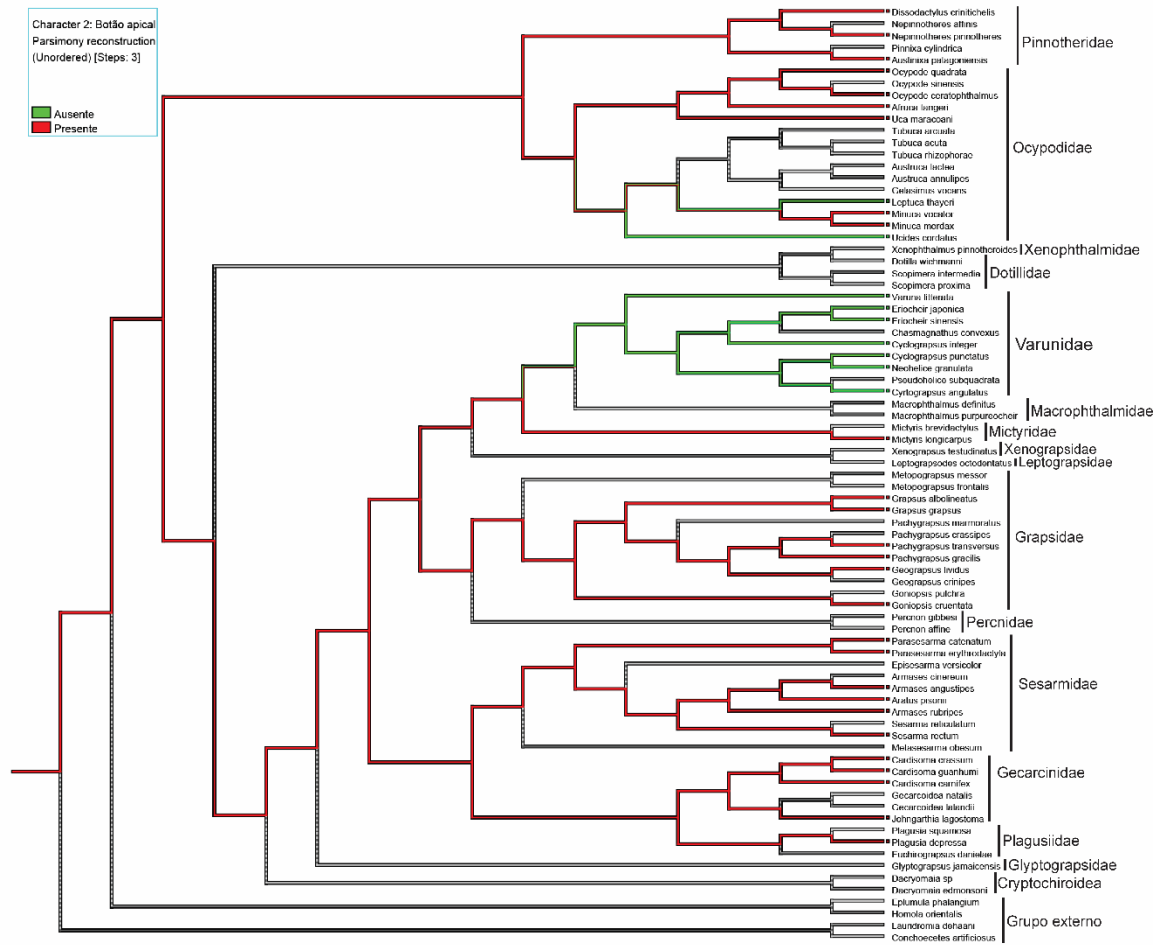


Figura 10. Mapeamento do caráter “Botão apical”. Presença do botão apical como plesiomorfia de Thoracotremata. Verde= botão apical ausente; Vermelho= presença do botão apical.

Figura 11

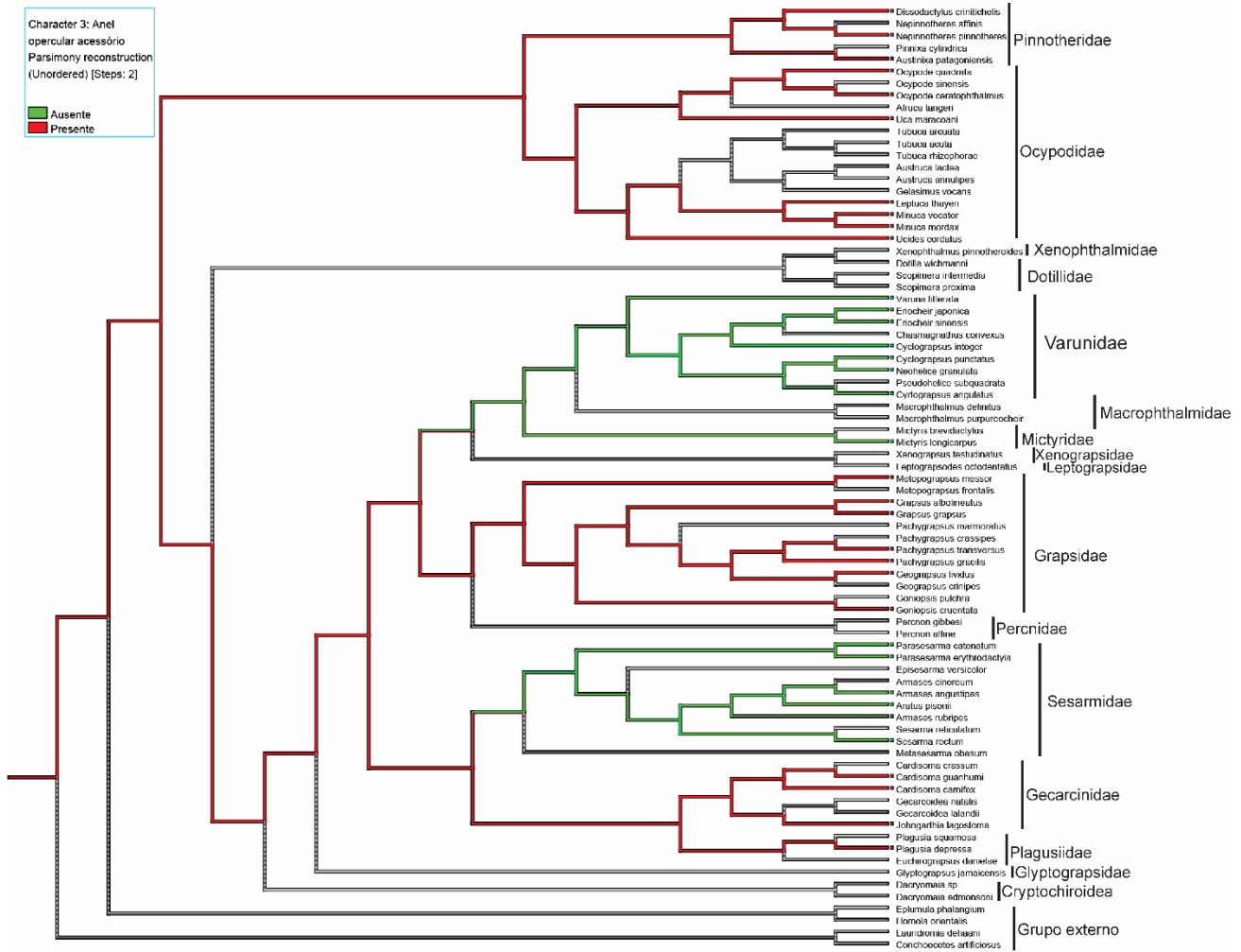


Figura 11. Mapeamento do caráter “Anel opercular acessório”. Anel opercular acessório como uma plesiomorfia de Thoracotremata, exibindo em verde espécies em que esta estrutura é ausente e em vermelho é presente.

Figura 12

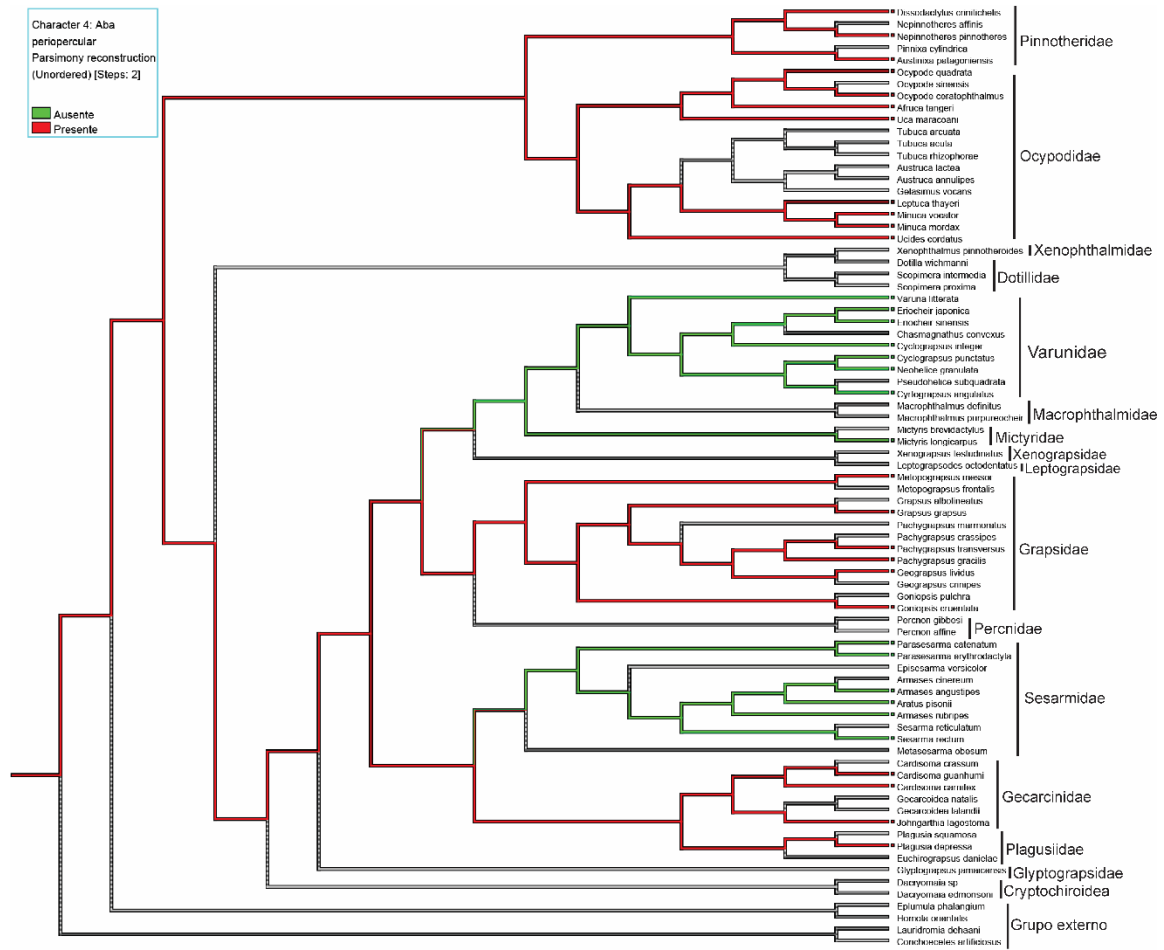


Figura 12. Mapeamento do caráter “Aba periopercular”. A presença da aba periopercular é plesiomorfia em Thoracotremata. Verde= aba periopercular ausente; Vermelho= aba periopercular presente.

Figura 13

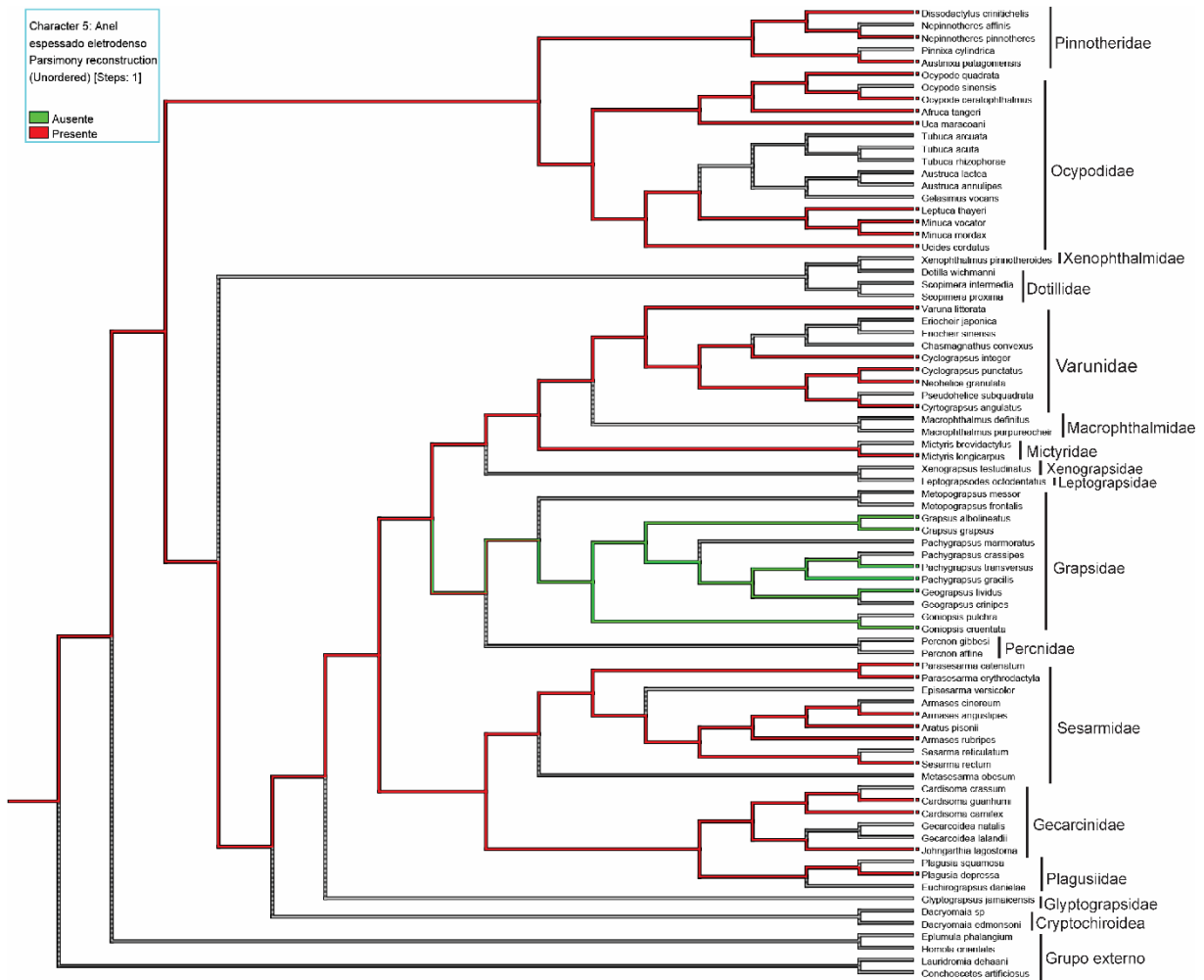


Figura 13. Mapeamento do caráter “Anel espessado eletrodenso”. Anel espessado eletrodenso presente em todas as famílias de Thoracotremata analisadas, exceto em Grapsidae. Verde= ausência do anel espessado eletrodenso; Vermelho= presença do anel espessado eletrodenso.

Figura 14

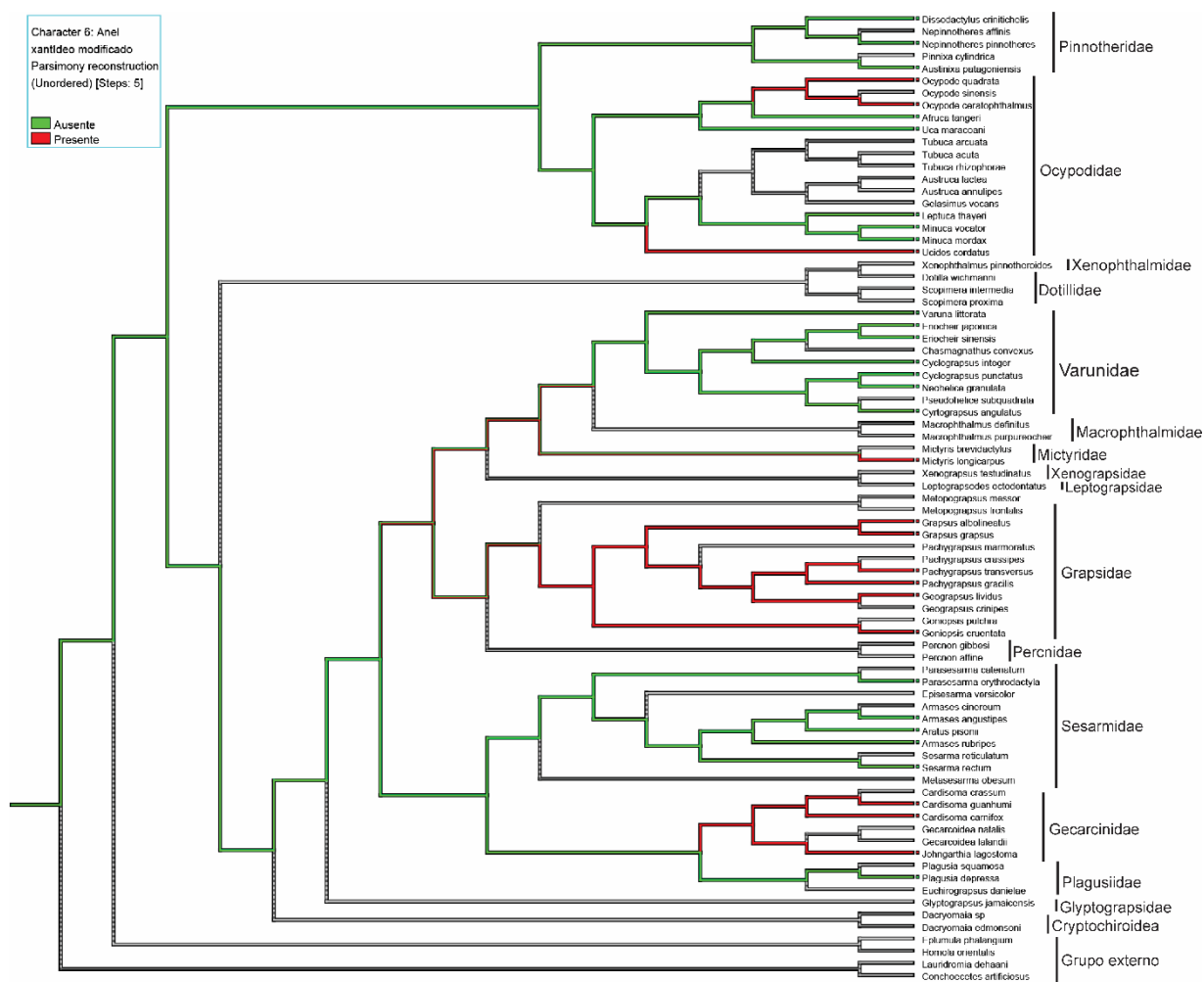


Figura 14. Mapeamento do caráter “Anel xantídeo modificado”. Caráter que mais variou dentre os táxons analisados. Observe que o anel xantídeo modificado é caráter plesiomórfico em Thoracotremata e que sua presença é observada de forma convergente em *Ucides*, *Mictyris*, táxons de Grapsidae e *Cardisoma* e *Johngarthia*.

Discussão

Este estudo refuta a hipótese inicial proposta neste capítulo de que existem características espermáticas robustas e exclusivas para a separação das espécies de Thoracotremata estudadas nas superfamílias Pinnotheroidea, Grapsoidea e Ocypodoidea. Pela filogenia molecular do capítulo I, os Ocypodoidea das famílias Macrophthalmidae e Myctiridae foram agrupados com o Grapsoidea da família Varunidae, como já descrito na literatura (Tsang et al., 2014, 2022; Wolfe et al., 2022, não revisado por pares; Sun et al., 2022). Em concordância com esta proposição, as características compartilhadas entre Varunidae e Macrophthalmidae, como opérculo não perfurado, ausência de aba periopercular e com Myctiridae, a ausência de aba periopercular e anel opercular acessório, os quais não são observados em nenhum outro Ocypodoidea, exceto em *U. cordatus*, o qual tem opérculo não perfurado.

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 capítulo. Contudo, uma família foi problemática neste contexto, Ocypodidae. As espécies de Ocypodinae *O. quadrata* e *O. ceratophthalmus* apresentam as sinapomorfias, opérculo perfurado, presença do anel xantídeo modificado, botão apical e aba periopercular (Jamieson, 1991, 1994), e compartilham com Gelasiminae as características como anel opercular acessório e a presença de três zonas acrossomais (Medina, 1992; Medina & Rodríguez, 1992; Benetti et al., 2008), sendo a sinapomorfia de Gelasiminae, opérculo perfurado, presença de botão apical, anel opercular acessório e a ausência de anel xantídeo modificado. Quase todos estes caracteres estão ausentes em *U. cordatus*. O espermatozoide do caranguejo uça é único entre os Thoracotremata, apresentando as apomorfias opérculo não perfurado, ausência de botão apical, acrossomo com quatro zonas acrossomais, com a interna sendo raiada e a intermediária com aspecto de impressões digitais, as quais não foram descritas por Matos et al. (2000). As únicas características compartilhadas com Ocypodinae são a presença do anel xantídeo modificado, aba periopercular e anel opercular acessório. *Ucides* compartilha com Gelasiminae a aba periopercular e o anel opercular acessório. Na literatura, proposições taxonômicas levantaram que *Ucides* deveria ser mantido em uma família separada, devido a características como carapaça, estrutura corneal, segmentação pleonal, entre outras, as

quais são divergentes em relação aos membros tradicionais de Ocypodidae (Ng et al., 2008). Por outro lado, um outro estudo propôs que o gênero *Ucides* deve permanecer na família Ocypodidae, mas ser separado em uma subfamília própria, Ucidinae (Shih et al., 2016). Essa perspectiva reconhece as particularidades de *Ucides*, mas supõe a existência de vínculos taxonômicos com os demais membros da família. Os caracteres espermáticos evidenciam várias apomorfias para *Ucides*, mas com características compartilhadas com outros membros de Ocypodidae. Dessa forma, a resolução final sobre a posição de *Ucides* dependerá de uma avaliação mais aprofundada, considerando não apenas as características morfológicas, mas também evidências genéticas e outros critérios científicos pertinentes.

Por meio da combinação de análises morfológicas e filogenéticas, foi possível identificar os caracteres ancestrais em Thoracotremata e as relações entre grupos relacionados, oferecendo uma compreensão abrangente sobre a presença de padrões morfológicos específicos entre os táxons e suas famílias, além de elucidar pontos controversos ou duvidosos da literatura, como por exemplo a indicação da possível presença do anel xantídeo em ao menos um Grapsidae, levantada por Jamieson (1994), a qual ainda não foi elucidada. Em geral, os representantes deste estudo apresentam características típicas de espermatozoides observadas em Thoracotremata, que inclui, vesícula acrossomal composta por diferentes zonas acrossomais concêntricas, perda da zona acrossomal raiada, a presença de um botão apical preenchendo a perfuração opercular central e lamelas concêntricas (Jamieson, 1991, 1994; Jamieson & Tudge, 2000). Esses caracteres são considerados as principais sinapomorfias do grupo, embora haja variações na presença ou ausência dessas características entre suas famílias. A análise ultraestrutural dos espermatozoides dos representantes de Thoracotremata do presente estudo, juntamente com os dados disponíveis na literatura, reconstruídos por meio da filogenia proposta no capítulo I, revelou de maneira inédita que o ancestral comum deste grupo, provavelmente possuía opérculo perfurado, botão apical, anel opercular acessório, aba periopercular, anel espessado eletrodenso e ausência de anel xantídeo modificado.

Em Pinnotheridae, Mictyridae, Grapsidae, Sesarmidae, Gecarcinidae e Plagusiidae, a presença do opérculo perfurado pode ser considerada uma sinapomorfia. Por sua vez, observa-se que Ocypodidae é formado por dois clados. Diferente das outras famílias, o primeiro clado, constituído pelas espécies *U. cordatus*, *Tubuca arcuata* (de Haan, 1835),

Tubuca acuta (Stimpson, 1858), *Tubuca rhizophorae* (Stimpson, 1858), *Austruca lactea* (de Haan, 1835), *Austruca annulipes* (H. Milne Edwards, 1837) e *Gelasimus vocans* (Linnaeus, 1758), *L. thayeri*, *M. vocator* e *M. mordax*, é formado por espécies com opérculo perfurado e imperfurado. Os gêneros *Ucides* e *Leptuca* possuem opérculo contínuo, sendo uma apomorfia destas espécies. Os demais táxons do primeiro clado, *Ocypode sinensis* Dai & Yang in Song & Yang, 1985, *O. ceratophthalmus*, *O. quadrata*, *Afruca tangeri* (Eydoux, 1835) e *Uca maracoani*, em conjunto com as que formam o segundo, exceto os representantes de Varunidae, têm como característica comum a presença de um opérculo perfurado. Em Varunidae, de maneira exclusiva, observou-se um opérculo contínuo e imperfurado, caracterizado pela presença de uma delgada camada eletrodensa, recobrindo o local onde estaria a perfuração central do opérculo, sendo considerada sinapomorfia do grupo. O opérculo imperfurado representa um caráter homoplásico entre Ocypodidae e Varunidae. Segundo Jamieson *et al.* (1994), o Macrophthalmidae *Ma. crassipes* também possui opérculo contínuo. Apesar desta espécie não ter sido incluída na análise filogenética, *Macrophthalmus (Mareotis) definitus* Adams & White, 1849 e *Macrophthalmus (Mareotis) purpureocheir* Teng & Shih, 2015 estão inclusos, sendo ambos pertencentes ao segundo grande clado de Thoracotremata. Desta forma, se um opérculo contínuo também ocorrer nestas espécies, ele será um caráter homoplásico em relação às espécies de Ocypodidae, que apresentam opérculo imperfurado (*U. cordatus* e *L. thayeri*).

A presença do botão apical na região perfurada do opérculo foi considerada uma sinapomorfia de Thoracotremata (Jamieson & Tudge, 2000). Entretanto, sua presença nas famílias do grupo foi descrita como um caráter ambíguo e duvidoso pela literatura, devido sua ocorrência em alguns gêneros, como observado em *Ocypode*, mas sua ausência ou perda em *Macrophthalmus* (Jamieson, 1991, 1994; Jamieson *et al.*, 1995; Jamieson & Tudge, 2000). Por meio das análises ultraestruturais dos espermatozoides do presente capítulo e da literatura, fica claro que o botão apical ocorre em quase todas as famílias, e é compartilhado por espécies pertencentes à Pinnotheroidea, Ocypodoidea e Grapsoidea. Este caráter foi ausente em *U. cordatus* e *L. thayeri*. Como o botão apical foi observado em *M. mordax* e na filogenia molecular esta espécie compartilha um ancestral comum próximo com *U. cordatus* e *L. thayeri*, este caráter pode ter sido perdido nestes representantes. A sua presença também não foi observada entre todos os Grapsoidea Varunidae estudados, sendo esta a sinapomorfia da família e também no grupo irmão e

Macrophthalmidae, o qual pertence a superordem Ocypodoidea.

O anel opercular acessório foi comumente encontrado em Pinnotheridae, Ocypodidae, Grapsidae, Gecarcinidae e em *Pl. depressa*, o único Plagusiidae descrito até o momento. Enquanto a ausência deste anel foi característica nas famílias Varunidae, Mictyridae e Sesarmidae. Dentro da família Pinnotheridae, embora esta estrutura tenha sido descrita como ausente em *Pi. pisum*, esse anel está presente em *D. crinitichelis*, *A. patagoniensis* (capítulo II) e *N. pinnotheres* (Becker et al., 2013). Em Pinnotheridae, o anel está localizado próximo às margens laterais do opérculo, formando uma estrutura trilaminar com aparência curta, que difere do padrão mais alongado observado em Ocypodidae, Grapsidae, Gecarcinidae e Plagusiidae (Jamieson et al., 1996; Benetti et al., 2008, 2013; Tiseo et al., 2017). O anel opercular acessório foi descrito para os Heterotremata *Pilodius areolatus* (H. Milne Edwards, 1834) e *Calocarcinus africanus* Calman, 1909 (Jamieson et al., 1995), porém, assim como para os Thoracotremata, a função desta estrutura ainda não é conhecida. Estudos anteriores, como o de Anilkumar et al. (1999), sugeriram que o anel opercular acessório seria uma característica distintiva de *Me. messor* dentro da família Grapsidae. Porém, a reconstrução deste caráter demonstra que essa estrutura é comum em outras famílias de Thoracotremata e representa uma das plesiomorfias do grupo.

A presença da aba periopercular, foi considerada uma das principais características compartilhadas pelos membros da família Grapsidae e indicada como sinapomorfia do grupo (capítulo V). Porém, este estudo demonstra que essa característica também é encontrada em grupos taxonômicos relacionados, como Gecarcinidae e Plagusiidae, além do grupo formado por Pinnotheridae e Ocypodidae. Por outro lado, a aba periopercular está ausente em Varunidae e Sesarmidae, sendo considerada autapomorfia destas famílias. No ancestral do clado formado por Varunidae, Macrophthalmidae, Mictyridae, Xenograpsidae, Leptograpsidae, Grapsidae, Percnidae, Sesarmidae, Gecarcinidae e Plagusiidae, a aba periopercular estava presente, porém este caráter ancestral parece ter sido modificado entre os representantes de Varunidae e Sesarmidae, sendo considerado um caráter homoplásico entre as famílias.

O anel espessado mostrou-se um caráter bastante comum entre as famílias de Thoracotremata analisadas, sendo esta estrutura composta por uma linha curva, eletrodensa, que acompanha a superfície interna da cápsula acrossomal, na região que envolve a base da câmara perforatorial. De acordo com a literatura, essa estrutura está

presente exclusivamente em Heterotremata e Thoracotremata e foi considerada como uma das sinapomorfias de Eubrachyura (Jamieson, 1994). Apenas entre na família Grapsidae, esta estrutura parece estar ausente, como sugerido em Jamieson (1991, 1994). Contudo, parece existir um anel nesta família, porém com aspecto menos eletrodenso que observado na literatura. De qualquer maneira, inexistente ou com outra composição química, esta é a sinapomorfia de Grapsidae. Este padrão é distinto do anel espessado eletrodenso compartilhado entre Pinnotheridae, Ocypodidae, Varunidae, Grapsidae, Gecarcinidae e Plagusidae (Jamieson, 1991, 1994; Medina e Rodríguez, 1992; Jamieson & Tudge, 2000). Em relação a funcionalidade desta estrutura, poucos estudos disponíveis sobre os processos de reação do acrossomo em caranguejos, indicam que o anel espessado desempenha um importante papel no processo de eversão da vesícula acrossomal, para a fertilização dos ovócitos (Brown, 1966; Medina & Rodriguez, 1992). Em Thoracotremata, os estudos se concentram principalmente em duas espécies: *Af. tangeri* Medina & Rodriguez (1992) e *E. sinensis* Wang et al. (2015). No entanto, apenas para *Afruca* foi abordado especificamente o papel do anel espessado. Nesta espécie, a reação do acrossomo foi induzida utilizando-se um indutor artificial, o ionóforo de cálcio A24187. Medina & Rodriguez (1992) mostraram que o anel espessado parece formar uma espécie de “túnel” que permite a passagem dos conteúdos da vesícula acrossomal, tais como as zonas acrossomais, a câmara perforatorial e o núcleo. De maneira semelhante, o anel espessado em Portunidae, forma uma estrutura em anel que permite a passagem do túbulo acrossomal para que o mesmo entre em contato com a membrana do ovócito, durante as fases finais da reação do acrossomo (Brown, 1966).

A reconstrução ancestral de caráter, baseada na proposta filogenética apresentada no capítulo I, indica que a ausência do anel xantídeo modificado é um caráter plesiomórfico em Thoracotremata. Por outro lado, sua presença foi compartilhada entre espécies de Ocypodidae, Mictyridae, Grapsidae e Gecarcinidae, sendo considerada homoplasia entre as famílias. Além disso, foi observado entre os representantes do grupo, a existência de três padrões morfológicos distintos para essa estrutura. O primeiro padrão consiste em um anel xantídeo modificado espesso, que ocorre desde a região anterior do anel espessado ou, quando esse anel está ausente, o mesmo ocorre desde a região anterior da base da vesícula acrossomal (como em Grapsidae). Esse padrão foi observado em várias espécies, incluindo os ocipodídeos do gênero *Ocypode*, o mictirídeo *Mic. longicarpus*, os grapsídeos *Gr. grapsus*, *P. transversus* e *P. gracilis*, *Ge. lividus*, *Go.*

cruentata e o gecarcinídeo *J. lagostoma*. A segunda morfologia é caracterizada por um anel xantídeo modificado delgado, que ocorre desde a região anterior do anel espessado, no qual foi observado exclusivamente no Ocypodidae *U. cordatus*. O terceiro modelo consiste em um anel xantídeo modificado espesso, que ocorre desde a base da câmara perforatorial, típico para as espécies do gênero *Cardisoma*. Apesar da presença do anel xantídeo modificado ter sido evidenciado em outros táxons de Thoracotremata, como nos Ocypodidae *O. ceratophthalmus*, Myctiridae *Mic. longicarpus*, nos Gecarcinidae *Ca. carnifex* e *Ca. guanhumi* (Jamieson, 1991; 1994; Jamison et al., 1996), nenhum trabalho indica diferenças na morfologia desta estrutura, o que foi discutido pela primeira vez neste estudo. A análise da ocorrência dos três tipos de morfologia entre as espécies filogeneticamente relacionadas, mostra que o padrão mais comum entre Thoracotremata é a presença de um anel xantídeo modificado espesso, que ocorre desde a região anterior do anel espessado. Desta maneira, a morfologia do anel xantídeo modificado em *U. cordatus* e *Cardisoma* spp. podem ser consideradas autapomorfias das espécies e do gênero.

Em conclusão, ao combinar análises morfológicas e filogenéticas, este trabalho indicou que opérculo perfurado, botão apical, anel opercular acessório, aba periopercular, anel espessado eletrodenso e ausência de anel xantídeo modificado são caracteres plesiomórficos à Thoracotremata. Este estudo utilizou a análise ultraestrutural dos espermatozoides em famílias pertencentes à Pinnotheroidea, Ocypodoidea e Grapsoidea e refutou a ocorrência das características espermáticas que definam as superfamílias de Thoracotremata. Entretanto, com exceção de Ocypodidae, todas as outras famílias de Thoracotremata apresentam sinapomorfias e a ultraestrutura reflete a organização molecular proposta. Assim, este trabalho representa a linha de base para estudos futuros e sinaliza a necessidade de aprofundar o conhecimento espermático em Ocypodidae, a fim de encontrar uma sinapomorfia para esta família e verificar a hipótese de que os caracteres espermáticos são homogêneos entre representantes das mesmas famílias. Ao combinar análises morfológicas e filogenéticas, este trabalho indicou que opérculo perfurado, botão apical, anel opercular acessório, aba periopercular, anel espessado eletrodenso e ausência de anel xantídeo modificado são caracteres plesiomórficos à Thoracotremata.

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(2), 361-370. <https://doi.org/10.1163/193724099X00178>
- Assugeni, C. D. O., Magalhaes, T., Bolanos, 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(12), 1628-1646. <https://doi.org/10.1002/jmor.20737>
- 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(11), 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>
- Benetti, A. S., Tavares, M., Carvalho dos Santos, D., & Tudge, C. (2013). Ultrastructure of the spermatophores and spermatozoa from the gecarcinid land crab, *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1828, (Crustacea, Brachyura, Gecarcinidae) from the western Atlantic. *Invertebrate Reproduction & Development*, 57(1), 61-69. <https://doi.org/10.1080/07924259.2012.666506>
- Braga, A., Nakayama, C. L., Poersch, L., & Wasielesky, W. (2013). Unistellate spermatozoa of decapods: comparative evaluation and evolution of the morphology. *Zoomorphology*, 132, 261-284. <https://doi.org/10.1007/s00435-013-0187-2>
- Brown, G. G. (1966). Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm—egg interaction in the decapod *Callinectes sapidus*. *Journal of Ultrastructure Research*, 14(5-6), 425-440. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(66\)80073-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(66)80073-4)
- 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>
- Castro, P. (2015). Symbiotic brachyura. In *Treatise on Zoology-Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea, Volume 9 Part C (2 vols)* (pp. 543-581). Brill.
https://doi.org/10.1163/9789004190832_012
- Chen, J., Xing, Y., Yao, W., Zhang, C., Zhang, Z., Jiang, G., & Ding, Z. (2018). Characterization of four new mitogenomes from Ocypodoidea & Grapsoidea, and phylomitogenomic insights into thoracotreme evolution. *Gene*, 675, 27-35.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.06.088>
- 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>
- Guinot, D. (1977). Propositions pour une nouvelle classification des Crustacés, Décapodes, Brachyours. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences, Paris, serie D*, 285, 1049-1052.
- Guinot, D., Ng, N. K., & Moreno, P. A. R. (2018). Review of grapsoid families for the establishment of a new family for *Leptograpsodes* Montgomery, 1931, and a new genus of Gecarcinidae H. Milne Edwards, 1837 (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Grapsoidea MacLeay, 1838). *Zoosystema*, 40(sp1), 547-604.
- 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. [10.11646/ZOOTAXA.3665.1.1](https://doi.org/10.11646/ZOOTAXA.3665.1.1)
- 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 of the Royal Society of London. Series B: 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., Guinot, D., & Forges, B. R. (1996). Contrasting spermatozoal ultrastructure in two thoracotreme crabs, *Cardisoma carnifex* (Gecarcinidae) and *Varunu litterata* (Grapsidae) (Crustacea: Brachyura). *Invertebrate Reproduction & Development*, 29(2), 111-126. <https://doi.org/10.1080/07924259.1996.9672503>
- Jamieson, B. G. M., & Tudge, C. C. (2000). Crustacea–Decapoda. In ‘Reproductive Biology of Invertebrates. Volume IX, Part C. *Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny*. (Ed. BGM Jamieson.) pp. 1-95.
- Karnovsky, J. M. (1965). A formaldehyde glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 27, 1A-149A.
- Kitaura, J., Wada, K., & Nishida, M. (2002). Molecular phylogeny of grapsoid and ocypodoid crabs with special reference to the genera *Metaplax* and *Macrophthalmus*. *Journal of Crustacean Biology*, 22(3), 682-693. <https://doi.org/10.1163/20021975-99990281>
- Kobayashi, G., Itoh, H., & Nakajima, N. (2023). Molecular phylogeny of thoracotreme crabs including nine newly determined mitochondrial genomes. *Zoological Science*, 40(3), 224-234. <https://doi.org/10.2108/zs220063>.
- Luque, J., Allison, W. T., Bracken-Grissom, H. D., Jenkins, K. M., Palmer, A. R., Porter, M. L., & Wolfe, J. M. (2019). Evolution of crab eye structures and the utility of ommatidia morphology in resolving phylogeny. *BioRxiv*, 786087. <https://doi.org/10.1101/786087>
- Ma, K. Y., Qin, J., Lin, C. W., Chan, T. Y., Ng, P. K., Chu, K. H., & Tsang, L. M. (2019). Phylogenomic analyses of brachyuran crabs support early divergence of primary freshwater crabs. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 135, 62-66. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.02.001>
- Maddison, W. P. and D.R. Maddison. 2021. Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 3.7.
- Matos, E., Matos, P., Corral, L., & Azevedo, C. (2000). Ultraestrutura do espermatozóide de *Ucides cordatus* Linnaeus (Crustacea, Ocypodidae) do litoral norte do Brasil.

Revista Brasileira de Zoologia, 17(3), 753-756. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752000000300020>

- Matos, E. R., Santos, M. N. S., Corral, L., & Azevedo, C. (2001). Ultra-estrutura do espermatozóide de *Ocypode quadrata* Fabricius, 1787 (Crustacea, Ocypodidae) do litoral norte do Brasil. *Revista de Ciências Agrárias- Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 36, 131-135.
- Medina, A. (1992). Structural modifications of sperm from the fiddler crab *Uca tangeri* (Decapoda) during early stages of fertilization. *Journal of Crustacean Biology*, 12(4), 610-614. <https://doi.org/10.1163/193724092X00085>
- Medina, A., & Rodríguez, A. (1992). Spermiogenesis and sperm structure in the crab *Uca tangeri* (Crustacea, Brachyura), with special reference to the acrosome differentiation. *Zoomorphology*, 111(3), 161-165. <https://doi.org/10.1007/BF01632905>
- 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.
- Montanaro, J., Gruber, D., & Leisch, N. (2016). Improved ultrastructure of marine invertebrates using non-toxic buffers. *PeerJ*, 4, e1860.
- 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.
- 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*.
- Poore, G. C., & Ahyong, S. T. (2023). *Marine Decapod Crustacea: A Guide to Families and Genera of the World*. CSIRO PUBLISHING.
- Reger, J. F. (1970). Studies on the fine structure of spermatids and spermatozoa of the crab, *Pinnixia* sp. *Journal of Morphology*, 132(1), 89-99. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051320106>
- Ro, S., Talbot, P., Leung-Trujillo, J., & Lawrence, A. L. (1990). Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: segments 1–3. *Journal of Crustacean Biology*, 10(3), 455-468. <https://doi.org/10.2307/1548335>
- Shih, H. T., Ng, P. K., Davie, P. J., Schubart, C. D., Türkay, M., Naderloo, R., Jones, D. & Liu, M. Y. (2016). Systematics of the family Ocypodidae Rafinesque, 1815

- (Crustacea: Brachyura), based on phylogenetic relationships, with a reorganization of subfamily rankings and a review of the taxonomic status of *Uca* Leach, 1814, sensu lato and its subgenera. *Raffles Bulletin of Zoology*, 64.
- Schubart, C. D. (2000). Use of mitochondrial 16S rRNA gene for phylogenetic and population studies in Crustacea. *The biodiversity crisis and Crustacea*.
- 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>
- Sun, S. E., Jiang, W., Yuan, Z., & Sha, Z. (2022). Mitogenomes provide insights into the evolution of Thoracotremata (Brachyura: Eubrachyura). *Frontiers in Marine Science*, 9, 848203. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.848203>
- 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*, 269, 166-176. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2017.07.002>
- Tsang, L. M., Schubart, C. D., Ahyong, S. T., Lai, J. C. Y., Au, E. Y. C., Chan, T.-Y., Ng, P. K. L., & 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). Sperm morphology and its bearing on decapod phylogeny. In J. W. Martin, K. A. Crandall, & D. L. Felder (Eds.), *Decapod crustacean phylogenetics*. Crustacean issues 18. Boca Raton: Taylor and Francis/CRC Press.
- Wang, Y. L., Sun, W. J., He, L., Li, Q., & Wang, Q. (2015). Morphological alterations of all stages of spermatogenesis and acrosome reaction in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Cell and Tissue Research*, 360, 401-412. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-2092-5>

- Wang, Q., Wang, J., Wu, Q., Xu, X., Wang, P., & Wang, Z. (2021). Insights into the evolution of Brachyura (Crustacea: Decapoda) from mitochondrial sequences and gene order rearrangements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 170, 717-727. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.210>
- Wolfe, J. M., Ballou, L., Luque, R., Watson-Zink, V. M., Ahyong, S. T., Barido-Sottani, J., Chan, T. Y., Chu, K. H., Crandall, K. A., Daniels, S. R., Felder, D. L., Mancke, H., Martin, J. W., Ng, P. K. L., Ortega-Hernández, J., Palacios Theil, E. N., Pentcheff, D., Robles, R., Thoma, B. P., Tsang, L. M., Wetzer, R., Windsor, A. M., Bracken-Grissom, H. D. (2022). Convergent adaptation of true crabs (Decapoda: Brachyura) to a gradient of terrestrial environments. *BioRxiv*, 2022-12.
- Yasuzumi, G. (1960). Spermatogenesis in Animals as Revealed by Electron Microscopy. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 7(1), 73-78. <https://doi.org/10.1083/jcb.7.1.73>
- Zeng, J., Peng, S., Zhong, S., & Zhang, H. (2019). The spermatozoal ultrastructure of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*). *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 7(4), 181. https://doi.org/10.4103/JMAU.JMAU_48_18

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.