UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

MORFOLOGIA COMPARADA DOS DUCTOS GENITAIS FEMININOS E GONÓPODOS MASCULINOS DE CARANGUEJOS EUBRACHYURA (SAINT LAURENT, 1980)

LEONARDO PERES DE SOUZA

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista para a obtenção do titulo de doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

RIO CLARO
SÃO PAULO – BRASIL
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

MORFOLOGIA COMPARADA DOS DUCTOS GENITAIS FEMININOS E GONÓPODOS MASCULINOS DE CARANGUEJOS EUBRACHYURA (SAINT LAURENT, 1980)

LEONARDO PERES DE SOUZA

Orientadora: Maria Izabel Camargo Mathias

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista para a obtenção do titulo de doutor em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular).

RIO CLARO
SÃO PAULO – BRASIL
2013

595.3 Souza, Leonardo Peres de
S729m Morfologia comparada dos ductos genitais femininos e gonópodos masculinos de caranguejos Eubrachyura (Saint Laurent, 1980): reprodução em caranguejos Eubrachyura / Leonardo Peres de Souza. - Rio Claro, 2013
144 f. : il., figs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Maria Izabel Camargo Mathias

1. Crustáceo. 2. Sistema copulatório. 3. Brachyura. 4. Cópula. 5. Receptáculo seminal. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Dedico esta tese

A minha querida mãe Dalila Peres de Souza e ao meu pai Anselmo Alves de Souza (in memoriam) pelo apoio, encorajamento, amor e pelos ensinamentos que formaram os alicerces de minha vida. Dedico também a minha esposa, Galyléia, grande amiga, sempre presente na minha vida, pela cumplicidade, companheirismo e apoio.

AGRADECIMENTOS

Um dos grandes prazeres da vida é ter a oportunidade de poder agradecer as pessoas que colaboram, que são gentis, que reconhecem o seu esforço e que entendem ou criticam de forma inteligente seu trabalho. Assim, gostaria de prestar os meus sinceros agradecimentos às pessoas, cuja ajuda direta ou indireta, tornou possível a realização deste trabalho.

A Deus, por ser aquele que me fortalece, me guia, me ampara e me ilumina sempre. Quem confia em ti não teme as derrotas.

Aos meus pais, Dalila e Anselmo, minha base maior, obrigado por todo carinho, dedicação, amor, palavras de sabedoria, ensinamentos e, principalmente, por serem exemplos de caráter, dignidade e força. Obrigado por SEMPRE respeitarem e apoiarem meus sonhos e ideais. Amo vocês!

Ao minha esposa, Galyleia, muito obrigado por todo amor, compreensão, carinho e amor incondicional que você me proporcionou. Tenho muita sorte de tê-la ao meu lado, apoiando minhas decisões e não me deixando desistir de meus sonhos. Te amo, hoje e sempre!

Aos meus irmãos, cunhadas e sobrinhos que sempre estiveram ao meu lado, pelo apoio e carinho durante todos estes anos.

A família da minha esposa, que sempre me receberam muito bem. Em especial aos meus sogros, Eleonora e Elício, que me tem como um filho! Muito obrigado.

A minha cunhada, Gabryela, a Samuel Augusto e meu sobrinho Ítalo Gabriel, por todos os ótimos momentos vividos juntos.

A Profa. Dra. Maria Izabel Camargo-Mathias e Prof. José Roberto, que tenho como exemplo de dedicação, profissionalismo e paciência. Muito obrigado pelas oportunidades concedidas e pelos ensinamentos.

Aos amigos, Marcos Leite, Jonathas Lira, Jussiara Linhares e Roberto Gomes grandes companheiros nessa jornada, sempre presentes na hora e nos momentos certos.

A todos os alunos de pós-graduação e pós-doutorado da Universidade Estadual Paulista e da Universidade Federal do Ceará com quem tive o um bom convívio durante esse período doutorado.

Aos amigos, Andrea Mendez, Edmara Nico e Ana Claudia Marcato, grandes amigas que ganhei nesse doutorado. Muito obrigado por me receberem tão bem.

Ao Doutorando Bruno Rodrigues, cuja ajuda foi essencial durante execução deste trabalho. Além de prestativo, foi sempre muito amigo.

Aos técnicos de laboratório Antônio Teruyoshi Yabuki, Gerson Mello, Monika Iamonte e Robson de Jesus pela atenção e cuidado dispensados durante a fase laboratorial deste trabalho.

Aos amigos Pablo Henrique Nunes e Alessandro Vieira pelos momentos de muitas risadas e descontração.

A Ronaldo catador de caranguejo e comunidade do Cumbe – Aracati, cujo auxílio foi sempre muito importante durante a execução dos trabalhos no estuário do Rio Jaguaribe.

Aos biólogos Felipe Monteiro, Carlos Meirelles e Jessica Alves pela elaboração e edição das imagens do presente trabalho.

Obrigado a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular) da UNESP de Rio Claro pelos conhecimentos transmitidos.

Agradeço a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro concedido, o qual possibilitou a realização deste trabalho (Processo n° 2009/52821-2).

A todos que estiveram presentes nessa caminhada,

SUMÁRIO

Resumo---------- 2

Abstract---------- 3

I. Introdução Geral---------- 4

II. Objetivos---------- 8

III. Revisão Bibliográfica---------- 10

III.1. O táxon Brachyura---------- 11

III.2. Estoque de espermatozoides e fertilização ---------- 13

III.3. Transferência dos espermatozoides---------- 15

IV. Material e Métodos---------- 17

V. Resultados---------- 21

Capítulo 1 - Comparative morphology of the female genital ducts of eubrachyuran crabs (Saint Laurent, 1980) with considerations on fertilization and phylogeny---------- 23

Capítulo 2 – Comparative morphology of gonopods and spermatozoa transference mechanism in Eubrachyura (Saint Laurent, 1980) (Crustacea: Decapoda: Brachyura)---62

Capítulo 3 - Histologia e histoquímica dos gonópodos de caranguejos Eubrachyura (Saint Laurent, 1980)---------- 91

VI. Discussão Geral---------- 118

VII. Conclusões---------- 126

VIII. Referências Bibliográficas ---------- 129

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

Trabalhos comparativos das características morfológicas dos ductos genitais femininos e dos gonópodos de caranguejos são escassos. Além disso, pouco se sabe sobre a participação dos ductos genitais no processo de fertilização e ainda como se dá a transferência dos espermatozoides para estes, via gonópodos masculinos. O presente trabalho descreve morfologicamente os ductos genitais femininos e os gonópodos de diferentes famílias de caranguejos Eubrachyura. As coletas foram realizadas no litoral cearense durante os anos de 2010 a 2013. Foram coletados machos e fêmeas de sete espécies de Eubrachyura. Em laboratório, as fêmeas foram dissecadas e o sistema reprodutor feminino analisado macro e microscopicamente (microscopia de luz). Os gonópodos dos machos foram retirados, fixados e processados para análise histológica e em microscopia eletrônica de varredura. Anatomicamente o sistema reprodutor feminino segue um padrão, consistindo de um par de ovários alongados e um par de ductos genitais que se estende até o exterior. Os ductos genitais de todas as espécies analisadas são constituídos de quatro regiões: oviduto, receptáculo seminal, vagina e gonóporo (abertura genital ou vulva). Os ovários podem se ligar ao receptáculo seminal nas regiões dorsal ou ventral. As características morfohistológicas encontradas nos ductos genitais, principalmente a forma da vagina e o tipo de epitélio secretor do receptáculo seminal, indicam que estes estão relacionados com a filogenia do táxon. Não foi possível observar o real local de ocorrência da fertilização, no entanto, os resultados obtidos permitiram inferir que o processo de fertilização se inicie no receptáculo seminal e seja concluído nos pleópodos. Em Eubrachyura, a transferência dos espermatozoides é realizada por meio da associação da papila peniana, primeiro e segundo gonópodos. Os dois últimos são recobertos por diferentes tipos de setas que, dependendo de sua morfologia e localização podem desempenhar funções como proteção, filtração, quimio e mecanorrecepção. Histologicamente, os gonópodos das espécies de caranguejos Eubrachyura analisadas apresentaram pouca variação, sendo constatada a presença de glândulas tegumentais em forma de roseta que atuam na formação do sêmen.

Palavras-chave: Fertilização, receptáculo seminal, sistema copulatório.

ABSTRACT

Comparative works on the morphological characteristics of female genital ducts and male gonopod in crabs are scarce. Besides, little is known about the role of the genital ducts on the fertilization process or how the sperm is transferred to them, via male gonopods. The present work makes histological analyses of the female genital ducts and male gonopods on different Eubrachyura crabs families. Samples were collected on the coastline of the State of Ceará, between years 2010 and 2013. Males and females from seven different species of Eubrachyura were collected. The females were dissected and the female reproductive system was analyzed macroscopically and microscopically (light microscopy). Male gonopods were removed, fixed and processed for histological analysis and scanning electron microscopy. Anatomically, female reproductive system follows a pattern, consisting on a pair of elongated ovaries and a pair of genital ducts that extends to the exterior. The genital ducts of all species analyzed were constituted of four regions: oviduct, seminal receptacle, vagina and gonopore (vaginal opening or vulva). The ovaries can be connected to the seminal receptacle on the ventral or dorsal region. The morphohistological characteristics found on the genital ducts, mainly the vagina shape and the type of secretory epithelium of the seminal receptacle, indicates that these were related to taxon phylogeny. It was not possible to evaluate the exact fertilization site, although, the results allow inferring that the fertilization process begins at the seminal receptacle and concludes at the pleopods. We conclude that, among Eubrachyura, sperm transfer is performed by the association of the papille penile, first and second gonopods. The last two are covered in various setae types that, depending on the morphology and location, may have functions like protection, filtering, chemo and mechanoreception. Histologically, the gonopods of the analyzed Eubrachyura species show little variation, having been found rosette-shaped integumentary glands that act on semen formation.

Keywords: Reproduction , seminal receptacles, copulatory system.

INTRODUÇÃO GERAL

I. INTRODUÇÃO GERAL

O táxon Crustacea inclui cerca de 67.000 espécies descritas de caranguejos, camarões, lagostins e lagostas, bem como uma miríade de animais pequenos que, com freqüência, passam despercebidos. Uma das classes, Malacostraca, representa cerca da metade das espécies conhecidas de crustáceos, estando representada pelos crustáceos mais conhecidos, como caranguejos, lagostas e camarões, pertencentes à ordem Decapoda (BRUSCA; BRUSCA, 2009). Esta ordem representa uma das com maior sucesso adaptativo entre os crustáceos, com mais de 14.700 espécies viventes, distribuídas em mais de 2.700 gêneros e com ampla distribuição (DE GRAVE et al., 2009). Em decorrência do seu grande tamanho, abundância e importância ecológica e econômica, são os estudados mais detalhadamente.

Ao contrário de outros Decapoda que mantiveram uma condição basal através da forma alongada do corpo, os caranguejos Brachyura sofreram significativa modificação em sua morfologia. De acordo com Stevic (1971), este táxon sofreu alterações morfológicas como a compactação e especialização de certas estruturas, apêndices e tagmas, evidentes, por exemplo, na redução do abdômen. Tal evento é conhecido como carcinização. Segundo Christtofersen (1988), os caranguejos, juntamente com camarões carídeos, lagostins e as lagostas, estão inclusos na subordem Pleocyemata. Este termo refere-se aos decápodes que incubam os ovos nos pleópodos, as brânquias são filobranquiadas e as larvas eclodem como zoea. Xavier-Filho (1995), em um estudo filogenético, afirmou que os táxons Brachyura e

Anomura, este último também referido pelo autor como Anomala, são grupos irmãos. Estes foram reunidos no táxon Meiura por Scholtz e Richter (1995).

Algumas espécies de caranguejos, por apresentarem um grande porte na fase adulta são utilizadas como fonte de alimento em várias regiões brasileiras, possuindo assim grande importância econômica (HATTORI; PINHEIRO, 2003) e, portanto, várias espécies de Brachyura que são estudadas geram resultados que trazem informações importantes ao setor pesqueiro, como biologia populacional, período reprodutivo, tamanho mínimo de captura, sendo poucos os trabalhos desenvolvidos com o objetivo de se compreender a estrutura e o funcionamento do sistema reprodutor.

O sistema reprodutor feminino de Decapoda constitui-se de um par de ovários e um par de ovidutos (KROL et al., 1992) ou ductos genitais (HARTNOLL, 1968). A posição dos ovários em Decapoda é lateral ou dorsal ao sistema digestório (ADIYODI; SUBRAMONIAM, 1983), podendo: a) se estender por toda extensão corporal ou b) estar limitado ao cefalotórax ou ao abdômen (KAESTNER, 1970). As gônadas de Brachyura, em ambos os sexos, são órgãos pareados localizados sob a carapaça e acima dos lobos anterior e posterior do hepatopâncreas. Os ovários estão conectados entre si abaixo do estômago e se estendem para a região posterior por baixo do pericárdio (WARNER, 1977), dando ao conjunto a forma de "H". Em Brachyura os ovários estão limitados quase que exclusivamente ao cefalotórax (ADIYODI; SUBRAMONIAM, 1983; KROL et al., 1992). Nas fêmeas de decápodes os ductos genitais (ou ovidutos) são estruturas tubulares que se estendem lateralmente conectando os ovários aos gonóporos (ADIYODI; SUBRAMONIAM, 1983; KROL et al., 1992), os quais se abrem no esternito ou na coxa do apêndice do sexto segmento torácico, correspondendo à base do terceiro par de pereiópodos (KAESTNER, 1970). Em Brachyura, o esperma pode ser estocado em uma porção modificada do ducto genital, o **receptáculo seminal** (KROL et. al., 1992; HARTNOLL, 1968) ou em uma invaginação do exoesqueleto, sem ligação com o ducto genital, a **espermateca** (GUINOT; QUENETTE, 2005).

O típico espermatozoide de Decapoda é caracterizado pela presença de uma zona central circundada por braços imóveis, sendo a peça intermediaria e flagelo ausentes (ADIYODI; SUBRAMONIAM, 1983). Em Brachyura, os espermatozoides são geralmente transferidos para as fêmeas em pequenos envelopes conhecidos como espermatóforos. Esta estrutura consiste em uma cápsula protetora formada no trato reprodutor masculino (KROL et al., 1992). A transferência é mediada pelo o primeiro e segundo pares de pleópodos,

comumente denominado de gonópodos. Estes são modificados para atuar como um órgão copulador (BRANDIS et al., 1999).

Muitas questões sobre a biologia reprodutiva de Brachyura ainda precisam ser esclarecidas, como a estrutura e o papel dos ductos genitais na fertilização e a morfologia dos apêndices responsáveis pela transferência dos espermatozoides para as fêmeas. Além disso, a descrição morfológica, incluindo a contextualização filogenética permitirá inferir sobre a existência de padrões no táxon Brachyura. A contribuição da presente pesquisa servirá como base para a elaboração de planos de manejos mais acurados para espécies economicamente importantes.

OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a estrutura dos ductos genitais femininos e dos gonópodos masculinos de diferentes espécies de caranguejos Eubrachyura.

Objetivos específicos:

1. Descrever histologicamente e histoquimicamente, os ductos genitais femininos de representantes das famílias Eriphiideae (*Eriphia gonagra*), Grapsidae *(Goniopsis cruentata*), Gecarcinidae (*Cardisoma guanhumi*), Ocypodidae (*Uca maracoani*), Portunidae (*Callinectes bocourti*), Menippidae (*Mennipie nodifrons*) e Ucididae (*Ucides cordatus*);
2. Determinar e relacionar os padrões morfológicos observados nestas famílias inserindo-os no contexto filogenético.
3. Verificar a participação dos ductos genitais femininos no processo de fertilização.
4. Relacionar a estrutura dos gonópodos masculinos com o processo de transferência dos espermatozoides para as fêmeas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

III.1. O táxon Brachyura

Em todo mundo, são descritas aproximadamente 6.793 espécies e subespécies de Brachyura, as quais se encontram distribuídas em aproximadamente 1.271 gêneros e subgêneros, 93 famílias e 38 superfamílias (NG et al., 2008). No Brasil, segundo Melo (1996) ocorrem 302 espécies, incluídas em 23 famílias e 161 gêneros. Obviamente, o número de espécies tende a aumentar. De acordo com NG et al. (2008), a grande maioria dos manguezais do mundo continua inexplorada, estando diversas espécies de caranguejos Grapsidae e Ocypodidae ainda não identificadas ou descritas. Além disso, o ambiente marinho ainda é pouco explorado.

A classificação sistemática mais utilizada atualmente para os Brachyura é a de Guinot (1977), que subdivide o táxon em três grupos: Podotremata, Heterotremata e Thoracotremata. Este autor partiu do princípio de que a posição primitiva dos orifícios genitais seria coxal, tanto nas fêmeas (no terceiro par de pereiópodos), como nos machos (quinto par de pereiópodos). A evolução do grupo teria ocorrido pela migração desses orifícios genitais para os esternitos correspondentes, fato que ocorreria primeiro nas fêmeas e mais tardiamente nos machos. Desta maneira, foi proposta a divisão em Podotremata, apresentando a condição primitiva tanto nos machos como nas fêmeas de orifícios genitais

coxais; Heterotremata, incluindo famílias cujo orifício genital masculino seria coxal e o feminino esternal; Thoracotremata com famílias cujos orifícios genitais localizar-se-iam no esterno em ambos os sexos. Esta condição seria a derivada. Saint Laurent (1980) propõe a inclusão dos Heterotremata e dos Thoracotremata como grupos irmãos em Eubrachyura, este sendo considerado monofilético (fig. 1). Essa classificação, juntamente com a sugerida por Guinot (1977) foi utilizada no presente trabalho.

Estudos filogenéticos para Brachyura foram realizados utilizando o desenvolvimento larval (WILLIAMSON, 1976; WILLIAMSON; RICE, 1996; RICE, 1980; MARTIN, 1991; MCLAY et al., 2001), registros fósseis (GLAESSNER, 1969; SCHRAM; MAPES, 1984; GUINOT, 1993; BISHOP et al., 1998; GUINOT E TAVARES, 2001), estrutura dos olhos (FINCHAM, 1980, 1984), ultraestrutura dos espermatozoides (JAMIESON, 1991; JAMIESON et al., 1995; GUINOT et al., 1994; 1998), analises moleculares (SPEARS et al., 1992) e caracteres morfológicos (XAVIER-FILHO, 2003). Guinot e Quenette (2005) sugerem que os estudos dos ductos genitais podem ser considerados de grande valor sistemático no entendimento da filogenia dos Brachyura.

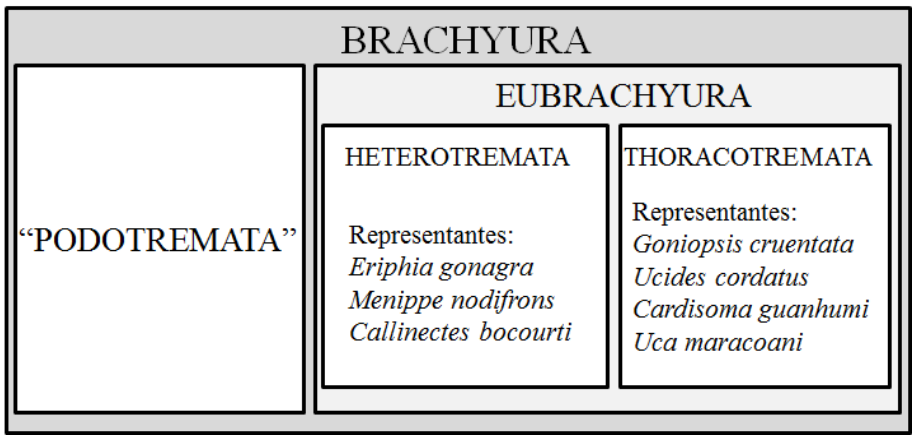

Figura 1 - Diagrama com a representação das relações hierárquicas dos Brachyura conforme as proposta de Saint Laurent (1980) e classificação das espécies utilizadas no presete trabalho. Fonte: adaptado de Xavier-Filho (2003)

Entre as espécies analisadas no presente trabalho, encontram-se representantes dos Heterotremata (*Callinectes bocourti* Portunidae, *Eriphia gonagra* Eriphiidae, *Menippe nodifrons* Menippidae) e Thoracotremata (*Goniopsis cruentata* Grapsidae, *Cardisoma guanhumi* Gecarcinidae, *Uca maracoani* Ocypodidae, *Ucides cordatus* Ucididae). Destas

espécies, apenas *E. gonagra, M. nodifrons* e *U. maracoani* não apresentam valor comercial, sendo utilizadas apenas na alimentação da população local ou como isca para pesca de peixe. As espécies *Callinectes bocourti, Goniopsis cruentata, Cardisoma guanhumi* e *Ucides cordatus* são bastante comercializadas no Nordeste brasileiro. De acordo com Dias Neto (2011) a produção brasileira total de caranguejo *U. cordatus* entre o período 1994 a 2007 sofreu uma variação, tendo sido registrado um pico de 15.500 toneladas (t) em 1994 e um mínimo de 6.800t em 2007. Já para o caranguejo *C. guanhumi* a produção durante esse mesmo período variou de 685t em 1994 atingindo um mínimo de 10,5t em 2004. O autor relaciona essa redução a alguns fatores, como a captura em excesso em algumas áreas e a degradação de áreas de manguezal.

III.2. Estoque de espermatozoides e fertilização.

Em crustáceos, diferentes estruturas se desenvolveram de maneira a permitir o estoque de espermatozoides pelas fêmeas, podendo em alguns táxons tais estruturas serem também sítios específicos para a fertilização. Em fêmeas de algumas espécies de camarões, lagostas, lagostins e caranguejos Podotremata, observa-se a ocorrência de áreas quitinosas parcial ou totalmente internalizadas para o estoque de espermatozoides pelas fêmeas. Segundo George (2005), outras espécies de Decapoda (exceto Brachyura) perderam a capacidade de estocar os espermatozoides internamente e os machos aderem a seus espermatóforos no esterno da fêmea. Ainda segundo este autor, esta região na fêmea pode ser modificada de maneira a apresentar protuberâncias ou reentrâncias que permitam o reconhecimento espécie-específico, fixação para a cópula, posicionamento e aderência dos espermatóforos.

Os mais elaborados órgãos de armazenamento de espermatozoides são observados em Brachyura, mais especificamente em espécies de Eubrachyura. Neste táxon os ductos genitais consistem de quatro regiões: oviduto, receptáculo seminal, vagina e abertura genital (gonóporo ou vulva). O oviduto consiste em um curto ducto que conecta o ovário a uma porção dilatada dos ductos genitais, o **receptáculo seminal**. Este tem a função de armazenar os espermatozoides por longos períodos de tempo após a cópula. O receptáculo seminal comunica-se com a vulva por meio da vagina (HARTNOLL, 1968) (fig. 2). Em Podotremata, os ovários comunicam-se com o exterior por meio de um ducto simples, que se abre na coxa do terceiro par de pereiópodos, enquanto o órgão de armazenamento, a espermateca, não apresenta conexão com o ducto genital, tendo abertura independente no esternito (GUINOT; QUENETTE, 2005).

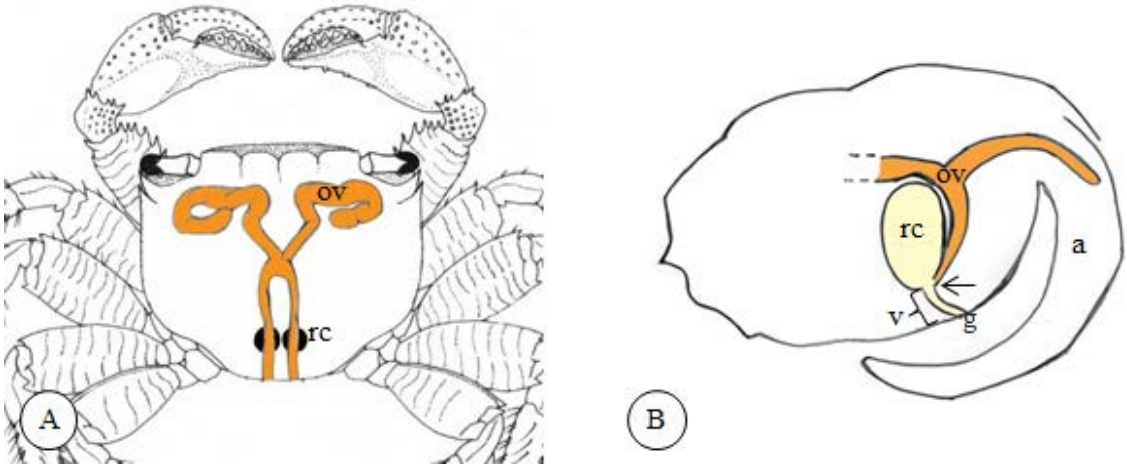

Figura 2 – A) Desenho esquemático do sistema reprodutor feminino de caranguejos Eubrachyura evidenciando a localização do sistema reprodutor feminino. B) Desenho esquemático de secção longitudinal evidenciando os ovários e os componentes do ducto genital feminino. Oviduto (seta), receptáculo seminal (rc), vagina (v), gonóporo (g) e abdômen. Fonte: adaptado de Souza e Silva (2009).

Segundo Adiyodi e Subramonian (1983) o receptáculo seminal é uma estrutura característica de espécies com fertilização interna. No entanto, as informações a respeito do local onde ocorre a fertilização em Brachyura são contraditórias. Binford (1993) sugere que em *Menippe mercenaria* a fertilização ocorre no lume do ovário, visto que espermatozoides são encontrados na superfície de ovócitos maduros e podem se desenvolver em embriões. Spalding (1942) reportou que a fertilização pode ocorrer tanto no ovário quanto no oviduto. Por outro lado, estudos com *Portunus sanguinolentus* (RYAN, 1967) e *Libinia emarginata* (HINSCH, 1971) sugerem que os espermatozoides entram em contato com os ovócitos internamente, mas o processo de fertilização ocorre externamente.

Descrições dos receptáculos seminais por meio de microscopia de luz foram realizadas para as espécies *Portunus sanguinolentus* (RYAN, 1967), *Carcinus maenas* (SPALDING, 1942), *Potamon* sp (BRANDIS et al.,1999), *Chionoecetes opilio* (BENINGER et al.,1988; SAINTE-MARIE; SAINTE-MARIE, 1998), *Eriocheir sinensis* (LEE; YAMAZAKY, 1990), *Inachus phalangium* (DIESEL, 1988; 1989), *Libinia spinosa* (MOYANO, 2010), *Chasmagnathus granulata* (LÓPEZ-GRECO et al., 1999) e *Uca* sp (LAUTENSCHLAGER et al., 2010). Das espécies utilizadas no presente estudo, apenas

Ucides cordatus (SANT'ANNA et al., 2007) e *C. guanhumi* (SOUZA et al., 2013) apresentam registros de estudo relativo à descrição histológica do receptáculo seminal.

Estudos relativos à anatomia e histologia dos ductos genitais permitem compreender questões pouco analisadas e discutidas acerca desta estrutura em Brachyura, como por exemplo, o seu papel na manutenção e maturação dos espermatozoides e na fertilização, bem como a composição das secreções dos receptáculos seminais.

III.3. Transferência dos espermatozoides

Nos Decapoda, o espermatozoide apresenta consideráveis modificações morfológicas, incluindo a perda de organelas, sendo considerado "atípico" devido à ausência de flagelo, ao contrário da maioria dos outros animais. O típico espermatozoide de Decapoda é caracterizado pela presença de uma zona central circundada por braços imóveis, estando a peça intermediária e o flagelo ausente (ADIYODI; SUBRAMONIAM, 1983). Os espermatozoides não são transferidos livremente em meio fluido, mas sim envoltos em um envelope protetor, o espermatóforo, formado por secreções produzidas pelas glândulas sexuais acessórias do macho, estrutura que protege os gametas durante a transferência para a fêmea (KROL et al., 1992). A formação dos espermatóforos pode se iniciar ainda nos testículos e encerrar na porção final do sistema reprodutor masculino (canal ejaculatório).

Devido ao fato dos espermatozoides de Brachyura serem imóveis, o sucesso da cópula depende da inserção precisa destes no sistema reprodutor feminino. Assim, a transferência do espermatóforo para a fêmea é realizada por ação do primeiro e do segundo par de pleópodos (gonópodos), modificados para atuar como órgão copulador acessório (HARTNOLL, 1969). Para assegurar o sucesso da fertilização, é essencial uma interação otimizada desses apêndices com os orifícios genitais femininos. A estrutura dos gonópodos, sua participação na constituição do fluido seminal e a interação espécie-especifica das estruturas envolvidas na transferência dos espermatozoides são ainda pouco descritas nos Brachyura.

Em Brachyura, os machos apresentam mecanismos que podem garantir a fertilização dos ovócitos pelos seus espermatozoides, impedindo a fertilização por outro macho. De acordo com Jensen et al. (1996), secreções provenientes dos machos, tem como função impedir a entrada de espermatozoides provenientes de cópulas subsequentes na espermateca. Tal secreção forma uma estrutura denominada de "plug" espermático (HARTNOLL, 1969). A estrutura e função desse "plug" em caranguejos foi analisada em

poucas espécies, como *Cancer magister* (OH; HANKIN, 2004), *Carcinus maenas* (SPALDING, 1942) e *Portunus pelagicus* (BAWAD; EL-SHERIEF, 1989). Desta maneira, observa-se que após a competição dos machos pelas fêmeas para ocorrência da cópula, esta ainda pode ocorrer ao nível de gametas (JENSEN et al. 1996). A competição espermática foi definida por Parker (1970) como a disputa entre o espermatozoide de dois ou mais machos para fertilizar o ovócito. Este processo não é exclusivo dos crustáceos, sendo também reportado para mamíferos, aves, peixes, anfíbios, aracnídeos e insetos (SMITH, 1984).

Observa-se, portanto, a escassez de estudos relativos ao mecanismo de transferência de espermatozóides e a morfologia dos apêndices envolvidos nesse processo. A estrutura dos gonópodos, bem como as estruturas cuticulares associadas a eles, foram pouco descrita para Brachyura (SPALDING, 1942; MARTIN; ABELE, 1986; BENINGER et al., 1991; BRANDIS et al., 1999; TSUCHIDA; FUJIKURA, 2000; MOYANO et al., 2011; LAUTENSCHLAGER et al., 2010; BECKER et al., 2012). Além disso, em algumas espécies, os gonópodos são considerados importante parâmetro de estudo da maturidade de caranguejos, visto que passam por modificações morfológicas quando o macho atinge a maturidade sexual. Desta maneira, analisar a morfologia dos gonópodos é uma ferramenta importante no embasamento para elaboração de mecanismos de manejo da reprodução de espécies comerciais e ameaçadas (BENINGER et al., 1991; LEITE, 2005; LIRA, 2012).

MATERIAL E MÉTODOS

IV. MATERIAL E MÉTODOS

Foram realizadas coletas durante os anos de 2010 e 2013 na praia do Pacheco – Caucaia (CE) (3°41'S; 38°37'O) e no estuário do Rio Jaguaribe – Aracati (CE) (4°30'S; 37°46'O), litoral nordeste brasileiro. Foram coletados fêmeas e machos representantes das famílias Eriphiidae (*Eriphia gonagra*), Menippidae (*Menippe nodifrons*), Grapsidae (*Goniopsis cruentata*); Gecarcinidae (*Cardisoma guanhumi*), Ocypodidae (*Uca maracoani*), Ucididae (*Ucides cordatus*) e Portunidae (*Callinectes bocourti*). A autorização para captura e transporte do material foi concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio - 24180-3).

Os animais coletados foram transportados vivos em recipientes plásticos contendo água do local para o laboratório de Embriologia e Histologia Animal da Universidade Federal do Ceará, onde foram anestesiados por resfriamento em congelador, por aproximadamente 15 minutos e posteriormente procedeu-se a dissecação.

Na dissecação foram registradas as características macroscópicas dos componentes dos ductos genitais (forma, cor e consistência) e dos ovários (cor, volume, extensão e consistência). Estes foram registrados com o objetivo de se determinar o estágio de desenvolvimento em que as gônadas se encontravam e se os exemplares utilizados já se apresentavam maduros.

Após as observações macroscópicas, fragmentos dos ductos genitais femininos e os gonópodos masculinos foram retirados e colocados em frascos contendo os fixadores para diferentes técnicas histológicas e histoquímicas. Foram utilizados como fixadores Glutaraldeido 2,5% (tampão cacodilato pH 7,2; 0,1M), paraformaldeído 4%, Bouin aquoso e Formol-cálcio. Após a fixação, o material foi desidratado em banhos de 30 minutos cada em

séries de álcoois em concentrações de 70-95% e transferido para resina de embebição onde permaneceu por 24 horas. A inclusão foi realizada em resina Leica e os blocos, depois de polimerizados em estufa (37ºC), foram seccionados em micrótomo. As secções de 4µm de espessura foram recolhidas em lâminas de vidro, colocadas em estufa à 37ºC e posteriormente submetidas as técnicas histológicas e histoquímicas. A técnica utilizada levou em consideração o tipo de fixador utilizado:

Técnica da Hematoxilina de Harris - Eosina Aquosa (adaptado de JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983):

As lâminas provenientes de fragmentos fixados com Glutaraldeido 2,5% (tampão cacodilato pH 7,2; 0,1M) foram coradas com hematoxilina de Harris durante 10 minutos, lavadas em água corrente por 2 minutos, para retirada do excesso e reação do corante e, a seguir, coradas com eosina durante 5 minutos. Após nova lavagem em água corrente, as lâminas foram secas à temperatura ambiente, montadas em Entellan.

Azul de bromofenol para detecção de proteínas totais (adaptado de JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

As lâminas provenientes de fragmentos fixados com Paraformaldeido 4% foram coradas pelo azul de bromofenol durante 2 horas, à temperatura ambiente. Logo após, foram lavadas com ácido acético 0.5% por 5 minutos e com água corrente por 15 minutos e a seguir montadas em Entellan.

Técnica de Baker para detecção de lipídios (adaptado BAKER, 1946)

As lâminas provenientes de fragmentos fixados com Formol-cálcio foram tratadas com bicromato de cálcio por 18 horas, lavadas várias vezes em água destilada e a seguir, foram mantidas em hemateína ácida por 5 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada a diferenciação em mistura Weigert 1%. Após lavagem em água destilada por várias vezes, as lâminas depois de secas, foram montadas com gelatina glicerinada.

Técnica do Ácido Periódico-Schiff (PAS) para detecção de polissacarídeos (Segundo JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983)

As lâminas provenientes de fragmentos fixados com Bouin aquoso foram colocadas em ácido periódico 1% durante 5 minutos e passadas por nova lavagem em água destilada. Posteriormente foram corandas com reagente de Schiff por 15 minutos, no escuro, e

foram submetidas à lavagem em água corrente por 10 minutos. Após a secagem, foram montadas em Entellan.

As lâminas obtidas contendo as secções coradas foram analisadas e as imagens capturadas em fotomicroscópio (Leica DM 1000) acoplado a microcomputador.

Com o objetivo de se analisar as estruturas associadas com a transferência dos espermatozóides para o ducto genital feminino, além da análise histológica, os gonópodos masculinos foram fixados em glutaraldeído 2,5% (tampão cacodilato de sódio pH 7,2; 0,1M) e submetidos à rotina de microscopia eletrônica de varredura.

Os gonópodos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (70-100%) por 10 minutos cada, levados ao ponto crítico, colocados em suporte de alumínio, onde receberam banho de ouro, e posteriormente foi examinado no microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Hitachi – TM3000). As setas de alguns gonópodos foram retiradas com uma navalha e posteriormente analisadas ao estereomicroscópio.

Nas espécies *Goniopsis cruentata, Cardisoma guanhumi, Uca maracoani* e *Ucides cordatus*, provenientes de ambientes lamosos, previamente à desidratação, submeteu-se os gonópodos a 15 minutos no ultrassom e limpos com um pincel para a retirada de detritos que viessem a dificultar a análise e registro das estruturas no MEV.

RESULTADOS

V. RESULTADOS

Os resultados obtidos no presente estudo estão sendo apresentados na forma de capítulos, os quais estão no formato de artigos, contemplando os diferentes objetivos propostos.

CAPÍTULO 1: COMPARATIVE MORPHOLOGY OF THE FEMALE GENITAL DUCTS OF EUBRACHYURAN CRABS (SAINT LAURENT, 1980) WITH CONSIDERATIONS ON FERTILIZATION AND PHYLOGENY

CAPÍTULO 2: COMPARATIVE MORPHOLOGY OF GONOPODS AND SPERMATOZOA TRANSFERENCE MECHANISM IN EUBRACHYURA (SAINT LAURENT, 1980) (CRUSTACEA: DECAPODA: BRACHYURA)

CAPÍTULO 3: HISTOLOGIA E HISTOQUÍMICA DOS GONÓPODOS DE CARANGUEJOS EUBRACHYURA (SAINT LAURENT, 1980)

CAPÍTULO 1

CAPÍTULO 1

TÍTULO: MORFOLOGIA COMPARADA DOS DUCTOS GENITAIS FEMININOS DE CARANGUEJOS EUBRACHYURA (SAINT LAURENT, 1980): CONSIDERAÇÕES A RESPEITO DA FERTILIZAÇÃO E DA FILOGENIA

TITLE: COMPARATIVE MORPHOLOGY OF THE FEMALE GENITAL DUCTS OF EUBRACHYURAN CRABS (SAINT LAURENT, 1980) WITH CONSIDERATIONS ON FERTILIZATION AND PHYLOGENY

RESUMO

Trabalhos que estabelecem associações entre as características morfológicas dos ductos genitais, mais especificamente dos receptáculos seminais, a um contexto filogenético são escassos. Além disso, pouco se sabe sobre a participação dos ductos genitais no processo de fertilização. O presente artigo teve como objetivos comparar as características morfológicas dos ductos genitais femininos de diferentes famílias de caranguejos Eubrachyura e relacionar os padrões morfológicos à evolução do táxon. As coletas foram realizadas no litoral cearense durante os anos de 2010 a 2013. Foram coletadas fêmeas de diferentes espécies de caranguejos Eubrachyura. Em laboratório, após a dissecação do sistema reprodutor feminino foi analisado macro e microscopicamente (microscopia de luz). O sistema reprodutor das diferentes espécies de Eubrachyura segue um padrão, consistindo de um par de ovários alongados e um par de ductos genitais que se estendem até o exterior. Os ductos genitais de todas as espécies analisadas são constituídos de quatro regiões: oviduto, receptáculo seminal, vagina e gonóporo (abertura genital ou vulva). Os ovários podem se ligar ao receptáculo seminal na sua região dorsal ou ventral. Em Heterotremata observam-se os dois tipos de ligação, enquanto que em Thoracotremata observa-se apenas ligação ventral, sendo esse tipo provavelmente o mais derivado. As características histológicas apresentadas pelos ductos genitais, principalmente da forma da vagina à organização tecidual dos receptáculos seminais estão relacionadas com a filogenia do táxon. Não foi possível observar o real local de ocorrência da fertilização. No entanto, as características relativas ao processo de fertilização e de extrusão dos ovos de Eubrachyura permitiram inferir que possivelmente o processo de fertilização se inicie no receptáculo seminal e seja concluído nos pleópodos.

Palavras-chaves: Receptáculo seminal, fertilização, Eubrachyura.

ABSTRACT

Few studies have explored the genital duct morphology of eubrachyuran crabs, especially with regard to the seminal receptacle. Likewise, little is known about the role of the genital ducts in fertilization. The present study compares the morphology of the female genital ducts of different families of eubrachyuran crabs from a phylogenetic perspective. Female specimens of Eubrachyura were collected on the seashore and in an estuary in Ceará (Northeastern Brazil) in the period 2010-2013. Following dissection, fragments of the female reproductive system were analyzed macro- and microscopically (light microscopy). In all species the reproductive system consisted of a pair of elongated ovaries and a pair of genital ducts communicating with the exterior through gonopores. The ducts featured four distinct components: oviduct, seminal receptacle, vagina and gonopore (genital opening or vulva). The ovaries and the seminal receptacle are connected dorsally or ventrally: in Heterotremata both positions occur, but the connection is invariably ventral in Thoracotremata, suggesting this taxon is more derived. The histological appearance of the genital ducts, especially the shape of the vagina and the tissue organization of the seminal receptacle, were analyzed in light of the evolution of the taxon. It was not possible to identify the exact location where fertilization occurs but, based on current knowledge of fertilization and spawning in Eubrachyura, it is probably initiated in the seminal receptacle and completed in the pleopods.

Keywords: Seminal receptacle, fertilization, Eubrachyura

1. INTRODUCTION

The Brachyura taxon can be divided in three groups based on the location of male and female genital orifices: the Podotremata, presenting a basal condition of coxal orifices; the Heterotremata, including families in which the male genital orifice is coxal and the female is sternal; and the Thoracotremata, with derived condition families, in which genital orifices are located in the sternum in both sexes (GUINOT, 1977; 1978). Saint Laurent (1980) includes Heterotremata and Thoracotremata as sister groups in a taxon denominated Eubrachyura.

In brachyurans, the female reproductive system consists of an H-shaped pair of ovaries and a pair of genital ducts (HARTNOLL, 1968). Located under the carapace, the ovaries are joined posterior to the stomach and extend towards the abdomen beneath the pericardium (WARNER, 1977). In some species of brachyurans, they reach as far as the third abdominal segment (SOUZA; SILVA, 2009; SOUZA et al., 2013). In eubrachyurans, four components may be distinguished in the genital ducts: oviduct, seminal receptacle, vagina and gonopore (genital opening or vulva). The oviduct is a short bridge between the ovary and the seminal receptacle (a dilated portion of the genital duct capable of storing spermatozoa over extended periods), whereas the seminal receptacle is connected to the vulva via the vagina (HARTNOLL, 1968; STERNBERG; CUMBERLIDGE, 2001). In contrast, in Podotremata the ovaries communicate with the exterior through a simple duct leading to an opening on the coxae of the third pair of pereiopods, while the spermatheca possesses an independent opening on the sternite, with no connection to the genital duct (GUINOT; QUENETTE, 2005).

The presence of a seminal receptacle in the genital ducts of eubrachyurans suggests that fertilization is internal in this taxon. However, published information regarding

the site (internal or external) of fertilization in Brachyura is contradictory. Thus, Binford (1993) suggests fertilization occurs in the ovarian lumen in *Menippe mercenaria*, based on the observation of spermatozoa on the surface of mature oocytes capable of developing into embryos. According to Spalding (1942), fertilization may occur in the ovary or in the oviduct. Conversely, in *Portunus sanguinolentus* and *Libinia emarginata*, while the spermatozoa reach the oocytes inside the reproductive system, fertilization occurs externally, in the abdominal region (RYAN, 1967; HINSCH, 1971). Morphological and functional analyses of the seminal receptacle can help identify the site of fertilization in brachyurans.

Detailed light microscopy descriptions of the genital ducts are available for the heterotremes *Portunus sanguinolentus* (RYAN, 1967), *Carcinus maenas* (SPALDING, 1942), *Potamon* sp (BRANDIS et al., 1999), *Chionoecetes opilio* (BENINGER et al.,1988; SAINTE-MARIE; SAINTE-MARIE, 1998) *Inachus phalangium* (DIESEL, 1988; 1989) and *Libinia spinosa* (MOYANO, 2010), for the thoracotremes *Eriocheir sinensis* (LEE; YAMAZAKY, 1990), *Uca* sp (LAUTENSCHLAGER et al., 2010) and *Cardisoma guanhumi* (SOUZA et al., 2013), and for members of the family Pinnotheridae (BECKER et al., 2011).

Phylogenetic inferences based on comparative studies of the morphology of the female genital ducts of brachyuran species were made by Hartnoll (1968), Guinot and Quenette (2005), McLay and Lopez-Greco (2011).

In the present study, we provide a detailed morphological description of the genital ducts of different families of eubrachyuran crabs. Our findings are interpreted in an evolutionary perspective in order to better understand the reproductive biology and fertilization patterns of this group of crustaceans.

2. MATERIALS AND METHODS

Fifty female specimens of seven species of eubrachyurans were collected in 2011-2012 on the seashore at Pacheco (3°41'11.75"S; 38°37'57.46"O) and in the estuary of the Jaguaribe river (4°30'6.59"S; 37°46'57.60"O) (Ceará, Northeastern Brazil). The sample represented families of the Heterotremata (Eriphiidae: *Eriphia gonagra*; Menippidae: *Menippe nodifrons*; Portunidae: *Callinectes bocourti*) and Thoracotremata (Grapsidae: *Goniopsis cruentata*; Gecarcinidae: *Cardisoma guanhumi*; Ocypodidae: *Uca maracoani*; Ucididae: *Ucides cordatus*). The capture and transportation of the animals was previously authorized by the Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio #24180-3).

Prior to the study procedures the animals were cold-stunned in a freezer for approximately 15 minutes. Then the carapace width was measured and the animals were dissected while the macroscopic characteristics of the ovaries (color, volume, extension and texture) and the genital duct components (shape, color and texture) were registered. In addition, the genital openings were examined for the presence of opercula and sperm plugs.

Different segments of the excised genital ducts were immersed in specific fixating solutions for histochemical analysis. The fixating agents included 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer, 4% paraformaldehyde, 10% formol-Ca and Bouin's aqueous solution. The samples were dehydrated serially in ethyl and embedded in Leica® resin.

Using a microtome, 4-µm sections were prepared and stained with hematoxylin-eosin (adapted from JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) (basophilic substances stain purple, acidophilic substances stain pink), bromophenol blue (adapted from PEARSE, 1960) (total protein quantification); PAS (adapted from JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) (glycoprotein detection) and Baker (adapted from BAKER, 1946) (lipid detection). The stained samples were photographed through a microscope (Leica DM 1000) connected to a computer.

3. RESULTS

3.1. Macroscopic characteristics of female genital ducts

In all the species evaluated the female reproductive system is bilaterally symmetrical, featuring a pair of dorsal ovaries and a pair of genital ducts communicating with the exterior through gonopores. The ovaries are elongated and connected by a short tranversal bridge posterior to the stomach and below the heart. The ovaries are initially thin and whitish. As they develop, they become longer and thicker, with gradual changes in color, until they occupy a considerable part of the cephalothoracic cavity. In thoracotremes and in *E. gonagra*, they extend as far as the third abdominal segment.

The genital ducts of all the species included in the study featured four distinct components: oviduct, seminal receptacle, vagina and gonopore (genital opening or vulva) (Figs. 1A, B and C).

Short and translucid, the oviduct connects the extremity of each ovary to the seminal receptacle. The connection is ventral in six species and dorsal in one (*C. bocourti*).

The seminal receptacles are ventral pouch-like expansions in all seven species. In portunids (*C. bocourti*), the surface of this pouch is thick and rigid. In the remaining species, the wall of the seminal receptacle is thin and whitish, and is easily disrupted by the touch of

the tweezers. In females with little developed ovaries, the receptacles are large and round or oval, while older individuals with larger ovaries filling the cephalothoracic cavity have smaller and laterally compressed receptacles. In some egg-bearing females, the receptacles are difficult to identify, probably because they are empty.

Variations in color, volume and texture of the seminal receptacle were observed inter and intraspecies. The seminal receptacle on the left and right side of the same individual were almost always macroscopically similar, but the contents occasionally presented differences in color between the ventral and dorsal portion. In some species (*E. gonagra, G. cruentata* and *U. maracoani*) the color ranged from clear to brown, in others (*M. nodifrons, C. guanhumi* and *U. cordatus*), from clear to whitish.

The underside of the receptacle is narrow and extends into a white end rigid duct (vagina) which is connected to the sternal opening (gonopore) at the height of the third pair of pereiopods. In some species (e.g. thoracotremes) the opening is operculated (Fig. 1C). The only operculated heterotreme species was *M. nodifrons* (Fig. 1B). None of the evaluated species had a external sperm plug sealing the vulva.

Upon dissection of the seminal receptacles, granular matter was observed in *G. cruentata* and *U. cordatus* (orange-colored) and in *E. gonagra* and *M. nodifrons* (brown). A macroscopic analysis of the vagina of a berried specimen of *E. gonagra* revealed embryos with developing lateral eyes (Fig. 1D).

3.2. Histological and histochemical analysis of female genital ducts

The different types of genital duct were identified by histological and histochemical analysis. Figure 2 presents a summary of the major tissue components of female genital ducts in Heterotremata and Thoracotremata along with the prevalent characteristics of each taxon.

Seminal receptacle

In all seven eubrachyurans, the lumen of the seminal receptacle was lined by a layer of loose connective tissue covered internally by epithelium. The layer of connective tissue is usually thin, except on the ventral side of the receptacle. In *C. bocourti*, however, the layer is thicker than in the other six species. The matrix of the connective tissue contains a mix of three types of cells: 1) myofibroblast-like cells (oval cells with nuclei containing chromatin granules and inconspicuous cytoplasm) (Figs. 3B-C), 2) granulocytes (hemal cells, usually with condensed nuclei and cytoplasm densely packed with eosinophilic granules)

(Fig. 3A), and 3) hyaline hemocytes (spherical cells with nuclei containing condensed chromatin and thin, lightly basophilic and non-granular cytoplasm (Fig. 3B).

The connective fibers are interspersed with hemal vessels lined by a thin acellular membrane. The vessels contain eosinophilic hemolymph of a granular appearance (which stains at different intensities) in addition to hyaline hemocytes.

Based on an analysis of the epithelium, different regions of the seminal receptacle were identified: 1) Ventral: columnar secretory epithelium. The apical pole is lined by a layer of cuticle which stains strongly with hematoxylin-eosin (Fig. 4A). The region may be convoluted due to connective tissue invaginations (Fig. 4C) or epithelial expansion (Fig. 4B); 2) Mid-dorsal: columnar secretory epithelium of species-specific composition. In Thoracotremata, the epithelium consists of eosinophilic cells (Fig. 4F). Some of the individuals displayed cells with elongated and convoluted nuclei (Figs. 4I-J). In *G. cruentata*, *U. cordatus* and *C. guanhumi*, projections were visible on the apical portion of the secretory cells (Figs. 4F and 4I). In the heterotremes evaluated, the mid-dorsal aspect of the receptacle was lined by stratified epithelium (*E. gonagra* and *C. bocourti*) or by simple columnar secretory epithelium (*M. nodifrons*) (Fig. 4H). In the former, the most basal cells display basophilic cytoplasm with some mitotic cells, whereas the apical cells gradually become larger and less basophilic, displaying granular cytoplasm (Fig. 4G). The most apical cells appear to degenerate and release their content into the lumen. In *M. nodifrons*, the release is apocrine.

The transition between the two regions (ventral and mid-dorsal) is in all species indicated by an increasing number of epithelial folds and by the gradual disappearance of the cuticle towards the mid-dorsal region (Figs. 2 and 4D). The folds are caused by connective tissue invaginations towards the lumen of the seminal receptacle and by the greater extension of columnar cells in this region, especially in *M. nodifrons* (Fig. 4E).

The Heterotremata *M. nodifrons* displays a different division of the seminal receptacle, most of which consists of columnar epithelium lined by cuticle, with secretory columnar epithelium restricted to a small area of the lateral aspect of the receptacle. Both regions are quite convoluted, making it difficult to determine the exact extension of each portion (Figs. 4C and 4E).

Oviduct

Lined by simple pavement epithelium on top of fibrous connective tissue (Fig. 5D), the oviduct joins the seminal receptacle at a point between the cuticle and the secretory region, except in *C. bocourti* in which the gonopore is located in the secretory dorsal region. The oviduct of *Uca maracoani* is lined by columnar epithelium (Fig. 5A). Only *E. gonagra* had spermatozoa inside the oviduct (Fig. 5D).

In Thoracotremata, at the point where the oviduct joins the seminal receptacle, the epithelium becomes proliferative, producing a cluster of cells with oval nuclei and poorly basophilic cytoplasm which projects from the oviduct towards the lumen of the seminal receptacle (Figs. 2 and 5B). The most distal cells display deformed and relatively condensed nuclei, the cytoplasm of which reacts to staining with HE at different intensities (Fig. 5C). No ducts connecting the lumen of the oviduct to the seminal receptacle were observed within this cell mass (Fig. 5A).

Vagina and gonopore

The vaginal lumen is lined by columnar epithelium covered by cuticle and supported externally by connective tissue. Two types of vagina were observed, one in each subsection (Heterotremata and Thoracotremata).

Thoracotremata: In cross-section, the vagina appears concave due to the invagination of one of the sides towards the lumen (Figs. 2 and 6A). The invaginated side consists of thick cuticle which is eosinophilic at the base and increasingly basophilic towards the lumen (Fig. 6D). This thickening and associated color change facilitates identifying the transition between the seminal receptacle and the vagina (Fig. 6E). The opposite side consists of epithelium with the apical portion covered internally by a weakly eosinophilic cuticle. A concentration of striated muscle is observed attached to the sternum and the invaginated side. In some specimens, the site of attachment of the muscles displayed protuberances due to the thickening of the cuticle (Figs. 6A and 6F).

Heterotremata: In cross-section, the vagina appears as a simple and usually oval duct with muscles inserted at several locations in the connective tissue. Internally in contact with the lumen, the cuticle is relatively uniform; in other words, no eosinophilic-basophilic gradient is observed. The epithelium is more extensive in the region where the muscles are attached to the vagina (Figs. 6B and 6G). In the distal portion of the seminal receptacle, near the vulva, a concavity is observed, though less pronounced than in Thoracotremata. The striated muscles are likewise attached to one of the sides of the vagina (Fig. 6C).

The vulvar operculum in thoracotremes and in *E. gonagra* consisted of thickened cuticle, with striated muscles attached to the inside and internally to the sternite. In some thoracotremes the operculum was partially decalcified.

Content of the genital ducts

The secretion collected from the seminal receptacles varied in distribution and quantity and stained at varying intensity, especially with HE.

In several specimens the seminal receptacle contained spermatozoa, either free or enclosed in a protective sac (spermatophore) (Fig. 7A). Spermatozoa are spherical cells with a basophilic cap (acrosome), an elongated, central eosinophilic region (perforatorium) and radial arms which react weakly to staining with HE. In *U. cordatus* and *M. nodifrons*, the spermatozoa were morphologically different, with poorly developed acrosome and evident cytoplasm producing a weakly basophilic halo around the perforatorium (Fig. 7F). On the other hand, the spermatozoa of *E. gonagra* and *G. cruentata* were deformed and the acrosome was absent or inconspicuous, probably partly degenerated (Fig. 7D).

In *E. gonagra,* the ventral aspect of the seminal receptacle and the vagina featured an internal sperm plug - a strongly eosinophilic secretion containing few spermatophores (Figs. 6B and 6H).

The granules observed in the seminal receptacles were found to be mature oocytes. In *G. cruentata*, the oocytes were surrounded by spermatozoa with well developed radial arms, as evidenced by intense basophilia (Fig. 7C). These characteristics were not evident in spermatozoa farther away from the oocytes (Fig. 7F).

Histochemistry

The epithelial secretion released into the lumen of the seminal receptacle and the hemolymph in the hemal vessels reacted to staining at varying intensity. Staining with Baker was invariably weak, but, despite variations, the secretory epithelium and the luminal secretion displayed in most samples a high concentration of glycoproteins and a moderate concentration of total protein, as evidenced by staining with PAS and bromophenol blue, respectively (Figs. 8A and 8B).

The spermatozoa, the cuticle and the connective fibers reacted at constant intensity. In all analised species, the spermatozoa stained strongly with PAS and bromophenol blue, especially the acrosome (Fig. 8C and 8D). The cuticle on the ventral side of the receptacle and in the vagina reacted weakly to these dyes. In addition, the invaginated portion

of the vagina in Thoracotremata displayed a reaction gradient, from the basal region (stronger) towards the lumen (weaker) (Fig. 8B). The connective tissue fibers lining the receptacle reacted weakly to bromophenol blue but nevertheless revealed a high concentration of glycoproteins upon staining with PAS (Fig. 8E).

4. DISCUSSION

4.1. Macroscopic characteristics of female genital ducts

Upon macroscopic analysis, the species evaluated in this study all presented genital ducts with four distinct components (oviduct, seminal receptacle, vagina and gonopore), confirming the pattern described by Hartnoll (1968) for brachyurans. The main inter-species difference observed was regarding the position of the junction between the oviduct and the seminal receptacle: the position was ventral (near the vagina) in some species and dorsal (opposite the vagina) in others. McLay and Lopez-Greco (2011) described species in which the ovaries are connected to the middle of the receptacle. In fact, in Heterotremata the position of the connection is known to vary between dorsal, intermediary and ventral (SPALDING, 1942; HARTNOLL, 1968; DIESEL, 1989; RYAN,1967; BENINGER et al., 1993; JENSEN et al., 1996; SAINTE-MARIE; SAINTE-MARIE, 1998; MOYANO et al., 2010; MCLAY; LOPEZ-GRECO, 2011). In the heterotremes evaluated in the present study, the connection was either ventral or dorsal, while the connection was predominantly ventral in the thoracotremes, matching descriptions in the literature on this taxon (LEE; YAMAZAKI, 1990; LOPEZ-GRECO et. al, 1999; SANT'ANNA et al., 2007; LOPEZ-GRECO et al., 2009; SOUZA; SILVA, 2009; BECKER et al., 2011; MCLAY; LOPEZ-GRECO, 2011).

In specimens with poorly developed ovaries, the seminal receptacles were large, whereas specimens with highly developed ovaries had small or laterally compressed receptacles, suggesting competition for space in the cephalothoracic cavity (WOLCOTT, 2005). It would seem that, due to space limitations and the rigidity of the carapace, the two organs cannot develop concurrently.

The observed differences in the coloring of the seminal receptacles of *E. gonagra*, *Uca maracoani* and *Goniopsis cruentata* may be explained by the presence of spermatophores stored over varying periods. The darker dorsal masses are older deposits, whereas the whitish ventral masses are from more recent copulations (GONZÁLEZ-GUARRIARÁN et al., 1998; TAYLOR et al., 1985). In fact, in *G. cruentata* and *E. gonagra* the dorsal region of the receptacle is usually described as brown. On histology, degenerating spermatozoa were observed, suggesting an extended storage time. Conversely, the presence of a whitish ventral

mass indicates a short time of storage (DULUC et al., 2005). The color of the seminal receptacle may also be determined by the color of the ejaculate received. Thus, in *Callinectes bocourti* the secretion found near the extremity of the male reproductive system and inside the seminal receptacle of the female are of the same pink color, suggesting the color of the organ is derived from the secretion it stores.

4.2. Histology of female genital ducts

Seminal receptacles

In the seven species included in this study, the seminal receptacle is lined externally by connective tissue. Connective fibers and myofibroblast-like cells were observed. According to Ross et al. (1993), myofibroblasts not only produce connective fibers but play an active role in contraction processes. The presence of such cells in crustacean reproductive systems has previously been suggested by Silva (1999) and Souza and Silva (2009). In addition, two types of hemocytes (hyalines and granulocytes), considered major types by Johnson (1980), were observed in the connective tissue. Martin and Hose (1992) demonstrated that the function of hemocytes in crustaceans is analogous to that of leukocytes in vertebrates in that they contribute to the recognition and removal of foreign bodies and participate in hemolymph coagulation. In the genital ducts, these cells probably eliminate foreign bodies, such as bacteria, introduced during copulation. Benhalima and Moriayasu (2001) observed bacterial colonies in the seminal receptacle of *Chionoecetes opilio* capable of destroying spermatophores and spermatozoa.

In all analised species, the seminal receptacle featured a single lumen, with a significant difference between the mid-dorsal secretory epithelium and the ventral cuticular epithelium. In Eubrachyura, this difference is believed to reflect differences in embrionary origin: the dorsal and mid-dorsal region is of mesodermal origin whereas the ventral region is of ectodermal origin (due to the presence of cuticle) (HARTNOLL, 1969). In Podotremata, the spermatheca is formed by the invagination of the external integument and is therefore of strictly ectodermal origin. In *C. opilio* (BENINGER et al., 1988) and *Inhacus phalangium* (DIESEL, 1989), the receptacle features a dorsal lumen for sperm storage and a ventral lumen for fertilization.

A ventral and mid-dorsal epithelial pattern, similar to that observed in the present study, has also been reported for the genus *Uca* (LAUTENSCHLAGER et al. 2010) and for *Pinnotheres pisum, P. pectunculi* and *Nepinnotheres pinnotheres* (BECKER et al., 2011), *Portunus sanguinolentus* (RYAN, 1967), *Callinectes sapidus* (JOHNSON, 1980), *Inhacus*

phalagium (DIESEL, 1989), *Ocypode quadrata* (LOPEZ-GRECO et al., 2009), *C. opilio* (BENINGER et al., 1993) and *C. guanhumi* (SOUZA; SILVA, 2013). Some species deviate from this pattern, such as *M. nodifrons* in which most of the receptacle is internally lined by cuticle and a small glandular area is seen dorsally, matching observations by Lautenschlager et al. (2010) for *U. forcipata* and *U. ecuadoriensis*. The secretory epithelium is predominantly simple in Thoracotremata and stratified in Heterotremata (Table 1).

The difference between Podotremata and Eubrachyura with regard to the extension of cuticular epithelium is reflected in the amount of spermatozoa stored, as suggested by McLay and Lopez-Greco (2011). Thus, in podotremes the entire spermatheca is lined internally by cuticular epithelium, limiting expansion, while in Eubrachyura part of the receptacle is cuticle-free, making it possible to expand and contain a larger amount of spermatozoa. This hypothesis is supported by the findings of the current study: the relatively small seminal receptacle of *M. nodifrons* is mostly lined by cuticle, while the somewhat larger receptacles of the other six species evaluated possess less extensive cuticular epithelium.

Cuticle-lined folds were observed at the point of transition between the two regions of the receptacle. In *C. opilio*, these are associated with muscles which appear to play a role in displacing the spermatozoa upwards, making room for new masses of spermatozoa or oocytes during ovulation. In the latter case, the muscles can also help direct the oocytes towards the vagina (SAINTE-MARIE; SAINTE-MARIE, 1998; BENINGER et al., 1993). However, none of seven species featured muscles associated with the cuticle-lined folds. The oocytes and the spermatozoa are apparently displaced towards the vagina by the contraction of myofibroblasts and cephalothoracic muscles. The latter probably also play a role in volume perception. According to Sainte-Marie (2007), this perception may rely on chemosensory structures or on the muscles of the dorsal aspect of the receptacle.

Oviduct

Eubrachyuran oviducts of vary histologically. In *Pinnotheres pectunculi, P. pisum* and *Nepinnotheres pinnotheres* the oviduct is lined internally by columnar epithelium and externally by connective tissue (BECKER et al., 2011). In *Chionoecetes opilio* (BENINGER et al., 1993), the structure is lined internally by columnar epithelium and externally by loose connective tissue and smooth muscle which displace the oocytes towards the seminal receptacle. Little variation was observed among the species evaluated in this study: the oviduct is entirely lined by pavement epithelium in six species and by columnar epithelium in one (*U. maracoani*). Externally, the structure is covered by connective tissue fibers only.

Thus, the oocytes are displaced towards the seminal receptacle by the contraction of the ovarian lining aided by the cephalothoracic muscles.

In Thoracotremata, the site where the oviduct and the receptacle are joined features a cluster of cells projecting towards the lumen. This cell mass is a proliferation of the epithelium lining the inside of the oviduct. A similar structure has been reported for other throracotrematans, including *Eriocheir sinensis* (LEE; YAMAZAKI, 1990), *Uca* (LAUTENSCHLAGER et al., 2010), Pinnotheridae (BECKER, 2011) and *C. guanhumi* (SOUZA et al., 2013). The structure is believed to prevent spermatozoa from entering the ovarian lumen (LEE; YAMAZAKI, 1990). In crabs of the genus *Uca*, the cell cluster appears to have a holocrine secretory function which possibly plays a role in fertilization (LAUTENSCHLAGER et al., 2010). In our specimens, the cell mass obstructed the passage between the oviduct and the seminal receptacle. The mass probably degenerates shortly before ovulation, allowing the oocytes to enter the receptacle. This process has been observed for *E. sinensis* by Lee and Yamazaki (1990).

Vagina and vulva

Based on his observations of different brachyurans, Hartnoll (1968) defined the vagina as either simple or concave. Both types occur in Heterotremata. For example, it is simple in *Carcinus maenas* (SPALDING, 1942), *Callinectes sapidus* (JOHNSON, 1980), *Cancer magister* (JENSEN et al., 1996), *Chionoecetes opilio* (SAINTE-MARIE; SAINTE-MARIE, 1998), *Inachus phalangium* (DIESEL, 1989) and in *M. nodifrons*, *E. gonagra* and *C. bocourti* (the present study), but concave in *Hyas coarctatus* and *H. araneus* (HARTNOLL, 1968). In Thoracotremata, the vagina is invariably concave, as in *Ciclograpsus integer*, *Pachygrapsus mormoratus* (HARTNOLL, 1968), *Eriocheir sinensis* (LEE; YAMAZAKI, 1990), *Pinnotheres pectunculi*, *P. pisum* and *Nepinnotheres pinnotheres* (BECKER et al., 2011), *Uca ecuadoriensis*, *U. forcipata, U. tangeri* (LAUTENSCHLAGER et al., 2010), *U. maracoani, G. cruentata, C. guanhumi* and *U. cordatus*.

The striated muscle associated with the invaginated wall of vaginas of the concave type makes it possible to control the opening of the vagina, minimizing fluid loss and thereby controlling fertilization and spawning (LAUTENSCHLAGER et al., 2010). This function is particularly important in semi-terrestrial species (*U. cordatus, G. cruentata* and *U. maracoani*) and terrestrial species (*C. guanhumi*). Since the vagina and the ventral aspect of receptacle are lined by cuticle, desquamation may occur during molt. At this time, the vagina muscles also help prevent loss of spermatozoa. In addition, according to Becker et al., (2011)

the vagina muscles and operculum are used to control gonopod penetration, suggesting an active female participation in the copulation process. In species with short gonopods, the vagina muscles help transport the deposited spermatozoa into the seminal receptacle. Some of thoracotremes displayed partial decalcification of the operculum with the likely purpose of facilitating the opening of the gonopore during copulation in the intermolt period, as suggested by Hartnoll (1969).

Content of genital ducts

In several specimens the lumen of the seminal receptacle contained spermatozoa, either free or enclosed in a protective sac (spermatophore). According to Spalding (1942), the sac protects the spermatozoa against exposure to seawater. This function is not necessary in eubrachyurans where the spermatozoa are deposited directly into the seminal receptacle without contact with the surrounding water. It is conceivable that the spermatophore represents a vestigial structure in Brachyura with regard to protection against the outside environment, while it retains the function of aggregating the spermatozoa during transference to the female.

The presence of both free spermatozoa and spermatophores in the same receptacle indicates that females use spermatozoa gradually. Beninger et al. (1988) have shown that spermatophores dissolve at varying rates in *C. opilio*; thus, spermatozoa are released and used in the receptacle gradually. This pattern is supported by the presence in the same receptacle of spermatozoa at different stages of maturation. In *U. cordatus* and *M. nodofrons*, an individual may display mature spermatozoa with little cytoplasm and evident acrosome as well as germinative cells with abundant cytoplasm and, occasionally, a burgeoning acrosome. In these species, the male probably transfers spermatozoa at different stages of maturation to be used gradually as they mature inside the female organ. In this study, *E. gonagra* and *G. cruentata* presented irregularly shaped spermatozoa with an absent or mostly degenerated acrosome. In a study by Moyano et al. (2010) on *L. spinosa*, this pattern was likewise associated with degenerating spermatozoa.

A whitish substance was observed in the ventral region of the seminal receptacle of *E. gonagra* and *C. guanhumi*. Histologically, this region is obstructed by strongly eosinophilic secretion (sperm plug). At least four hypotheses have been set forth to explain the function of the sperm plug: a) protetion and retention of spermatozoa in the seminal receptacle (RYAN, 1967); b) nourishment of the spermatozoa during storage (ADIYODI; ANILKUMAR, 1988); c) vestigial structure with no important function (HARTNOLL, 1969)

and d) paternity control mechanism preventing the introduction into the seminal receptacle of spermatozoa from subsequent copulations (DIESEL, 1989). Wolcott et al. (2005) dismissed the nourishment hypothesis in the case of *Callinectes sapidus*. In this species, the spermatozoa would be retained in the seminal receptacle in the interval between two reproductive seasons while the sperm plug has been reported to be in place a few weeks only. If the plug were a source of nourishment, one would expect it to disappear gradually, not suddenly, as observed by the author. Our failure to observe this structure in the other species evaluated may be due to its short-lived presence in the seminal receptacle. Species in which copulation is followed by the immediate release of oocytes, such as *U. cordatus*, are unlikely to develop sperm plugs since this would compromise the release of oocytes into the abdominal region.

Histochemical analysis of genital ducts

The finding of PAS positivity for the connective tissue fibers indicates they consist largely of elastin, a glycoprotein and the main component of elastic fibers (MELLON Jr., 1992). Elastic fibers have previously been described for the seminal receptacles of crabs. As suggested by Souza and Silva (2013) and by Beninger et al. (1988) for the species *C. guanhumi* and *C. opilio*, respectively, these fibers allow the receptacle to expand considerably during copulation. In addition, collagen fibers have been described for the seminal receptacles of *C. sapidus* (JONHSON, 1980) and *U. cordatus* (SANT'ANNA et al., 2007). According to Mellon Jr (1992), PAS positivity of the extracellular matrix is an indication of glycosaminoglycans.

Several authors have examined the secretions of eubrachyuran seminal receptacles and found them to consist of proteins and lipids (ANILKUMAR; ADIYODI, 1977; JEYALECTUMIE; SUBRAMONIAM, 1987; ANILKUMAR et al., 1996). In the present study, the main components identified were polysaccharides and proteins. Similar findings have been reported for *C. opilio* by Beninger et al. (1993), according to whom these glycoproteins are highly hygroscopic (an important property with regard to the opening of the spermatophores) as well as an important source of energy.

Anilkumar et al. (1996) found the most abundant substance in the seminal receptacle of *Metopograpsus messor* to be lipids, as opposed to the findings of Lanteigne et al. (1996) for *C. opilio* and *Hyas coarctatus* and in present work. Lipids are not only an important energy resource but also stimulate sperm motility (GURAYA, 1987). The latter function is not relevant in the case of our species since no structures were observed under

light microscopy which suggest that the spermatozoa possess this ability. The absence of flagella makes the spermatozoa atypical and justifies the low concentration of lipids in the seminal receptacle.

4.3. The role of the female genital ducts in fertilization

The position of the connection between the oviduct and the seminal receptacle is an important part of the fertilization mechanism. When the connection is ventral, near the connection with the oviduct, as in our thoracotremes and in the heterotremes *E. gonagra* and *M. nodifrons*, spermatozoa from the latest copulation are preferentially used. Conversely, when the connection is dorsal, as in *C. bocourt*, spermatozoa from the earliest copulation are given priority (BRINK; MCLAY, 2009; MCLAY; LOPEZ-GRECO, 2011). This view is further supported by the absence of structures such as cilia, conspicuous muscles in the lining of the seminal receptacle and flagella suggestive of sperm motility.

According to Gilbert (2006), despite variations between species, fertilization generally comprises four main events: 1) contact and recognition between oocyte and spermatozoon; 2) regulation of spermatozoon penetration (usually only one is allowed to enter the oocyte); 3) genetic fusion of spermatozoon and oocyte; and 4) activation of egg metabolism. The fusion of gametes may occur after their release in the environment (external fertilization) or inside the body, usually in the female reproductive organ (internal fertilization) (BECKETT, 1986). In Brachyura, it remains unclear how much time is required for fertilization, or, in other words, if the released oocytes remain long enough inside the seminal receptacle for complete fertilization. Goudeau (1982) observed that the spermatozoa of *Carcinus maenas* probably undergoes an acrosomal reaction, perforating the vitelline membrane in 5 minutes, while the spermatozoon membrane remains in contact with the oocyte for up to 15 minutes. Saker et al. (2009) observed fertilization membranes at 3 minutes and fertilization cones at 5 minutes after insemination em *Perisesarma bidens*. In *Libinia emarginata*, the perivitelline space of eggs spawned 30 minutes earlier displayed acrosomal contents and membranes from several spermatozoa. The acrosomal tubules, the radial arms and the nuclei of the spermatozoa remained attached to the surface of the oocyte, indicating incomplete fertilization (HINSCH, 1971). Based on these findings, complete fertilization likely requires a few minutes' permanence inside the seminal receptacle. During the field work for the present study, *U. cordatus*, *G. cruentata* and *E. gonagra* were observed to release their eggs within 30 to 120 minutes. These species incubate thousands of eggs in the abdomen (LINHARES, 2010; BARROS, 2007; GOES, 2000). In other words, since the time

the oocytes remain in the seminal receptacle appears to be insufficient for complete fertilization, the process probably initiates inside the receptacle and ends during incubation in the abdomen, as suggested for other species by Ryan (1967), Hinsch (1971) and Lee and Yamazaki (1990).

Mature oocytes were observed inside the seminal receptacles of *E. gonagra* and *G. cruentata*. In the latter species, the spermatozoa surrounding the oocytes displayed conspicuous extended radial arms, as opposed to the spermatozoa further away from the oocytes. According to Brown (1966) and Medina (1992), the function of the arms is to attach the spermatozoon to the oocyte, maintaining the acrosome in direct contact with the chorion enveloping the female germinative cell. In *G. cruentata*, the presence of oocytes in the receptacle seems to induce the radial arms of the spermatozoa to extend, favoring adhesion and fertilization.

The presence of embryos in the vagina of *E. gonagra* is likely due to the large number of eggs adhering to the pleopods. Apparently retained during ovulation, these embryos presented eyes at an early stage of development. Similar observations have been made for embryos a few days old (GÁRCIA-GUERRERO; HENDRICKS, 2004; YAMAGUCHI, 2001; PINHEIRO; HATTORRI, 2003).

4.4. Genital ducts and phylogenetic relationships

The brachyuran female reproductive system is rather complex. Thus, while the ovaries connect to the exterior through a simple duct in Podotremata, in Eubrachyura the duct possesses specialized dilatations to allow for the storage of spermatozoa. These dilatations may be considered a synapomorphic condition in Eubrachyura. The simple genital ducts is a apormorphic condition, as observed for Anomura, a sister taxon to Brachyura. A similar tendency was proposed by Bauer (1986) for the taxon Pleocyemata, the females of which incubate their eggs in the abdomen (e.g. caridean shrimp, Anomura, Brachyura). The author described a gradient of complexity in female genitals from Stenopodidea and Caridea towards Brachyura.

In this study, we are not suggesting the podotrematan spermatheca evolved into the eubrachyuran seminal receptacle. Likewise, the disappearance of the spermatheca in Podotrematas by reversion, followed by the appearance of the seminal receptacle in Eubrachyura, does not seem to be a plausible scenario. It is rather more likely that Podotremata and Eubrachyura display different solutions to the problem of sperm storage as a result of parallel evolution, as suggested by Lopez-Greco and McLay (2011). These authors

suggest that, in Eubrachyura, seminal receptacles of the dorsal type retain the ancestral trait, while those of the ventral type are derived. This is borne out by the observation that among eubrachyuran crabs, Hetetrotremata (considered the basic taxon) displays both types of connection, while all members of Thoracotremata (considered a derived taxon) have seminal receptacles with connections of the ventral type.

A similar tendency is observed with regard to the shape of the vagina. Hartnoll (1968) suggested that the simple type would be the basal form, while the concave type would be derived, having evolved from the simple type one or more times. The concave type is predominant in Thoracotremata whereas the simple type is most common in Heterotremata. The vaginas of the heterotremes *M. nodifrons* and *E. gonagra* feature a slightly concave terminal portion, possibly indicating an intermediate stage between the two shapes in Eubrachyura. Another trait observed only in Thoracotremata, suggesting a synapomorphy of the taxon, is the cell mass associated with the oviduct-receptacle connection. In short, primitive traits are predominant in Heterotremata while derived traits prevail in Thoracotremata, suggesting an evolutionary pattern.

Most of the controversy in the study of brachyuran phylogeny centers around the questions of whether Podotremata is monophyletic, paraphyletic or polyphyletic, whether Podotremata belong in Brachyura or not, and how the taxons of Eubrachyura relate to each other (AHYONG et al., 2007). According to NG et al. (2008), while the monophyly of the Eubrachyura is generally not in question, internal relationships are far from settled. Our findings do not allow to determine these relationships with certainty, in part because of the fragmentary nature of published data, which tend to focus on the structure of the seminal receptacle, leaving little room for the description of other components. In this study, heterotreme synapormorphies were difficult to establish due to variations in traits likely caused by polyphyleticism or paraphyleticism. Nevertheless, the morphological similarities between female genital duct structures in Thoracotremata lend support to the claim by Jamieson (1991), Jamieson et al. (1995) and Brosing et al. (2007) that the taxon is monophyletic. In Thoracotremata, the sternal location of the male and female gonopores and the presence of a sperm plug sealing the passage between oviduct and receptacle may be considered synapomorphies.

In short, the simple genital duct in Anomala, a sister taxon to Brachyura (XAVIER-FILHO, 1995), represents the basal form. Thus, in Podotremata the duct is simple while the spermatozoa are stored in a separate spermetheca. In Eubrachyura, the spermatozoa are stored in a modified dilated portion of the genital duct -- the seminal receptacle.

ACKNOWLEDGMENTS

The present study was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (filed under entry number 2009/52821-2). The authors would like to thank the technicians Gerson Mello Souza and Robson Jesus for their assistance with the histology procedures, and the biologist Felipe Augusto Correia Monteiro for image editing.

5. REFERENCES

ADIYODI, K. G.; ANILKUMAR. G. Arthropoda-Crustacea. In**:** ADIYODI K. G.; ADIYODI, R. G. **Reproductive biology of invertebrates, v.3 Accessory Sex Glands.** NEW YORK: Wiley-Liss, 1988.

AHYONG, S. T.; LAI, J. C. Y.; SHARKEY, D.; COLGAN, D. J.; NG, P. K. L. Phylogenetics of the brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda): The status of Podotremata based on small subunit nuclear ribosomal RNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 45,2007, p. 576–586.

ANIKUMAR, G.; ADIYODI, K. G. Spermatheca of the fresh water crab*, Paratelphusa hydrodromus* (Herbst) in relation to the ovarian cycle. In: ADIYODI, K. G., ADIYODI, R. G. (eds) **Advances in invertebrate reproduction.** Peralom-Kenoth, Kerala, 1977.

ANILKUMAR, G.; SUDHA, K.; ANITHA, E.; SUBRAMONIAM, T. Aspects of sperm metabolism in the spermatheca of the brachyuran crab *Metopograpsus messor*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 16, n. 2, p. 310-314, 1996.

BAKER, J. R. The histochemical regognition of lipine. **Quarterly Journal of Microscopical Science.** v. 87, p.441-470, 1946.

BARROS, T. B. **Fecundidade e desenvolvimento embrionário inicial do caranguejo aratu *Goniopsis cruentata* (Decapoda: Brachyura: Grapsidae), no manguezal do Rio Jaguaribe.** 2007. 50p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2007.

BAUER, R. T. Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. **Journal of Crustacean Biology**, v. 6, p. 313–325, 1986.

BECKER, C.; BRANDIS, D.; STORCH, C. Morphology of the female reproductive system of European pea crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Pinnotheridae). **Journal of Morphology**, v. 272, n. 1, p. 12-26, 2011.

BECKETT, B. S. **Biology: A modern introduction.** GCSE Edition. 1986, 328p.

BENHALIMA, K.; MORIYASU, M. Prevalence of bacteria in the spermathecae of female snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidae). **Hydrobiologia,** v. 449, p. 261-266, 2001.

BENINGER. P. G.; ELNER, R. W.; FOYLE, T. P.; ODENSE, P. H. Funcional anatomy of the male reproductive system and female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio*

(O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. **Journal of Crustacean Biology**, v. 8, n. 3, p. 322-332, 1988.

BENINGER, P. G.; LANTEIGNE, C.; ELNER, R. W. 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**, v. 13, p. 1–16, 1993.

BINFORD R. The germ-cells and the process of fertilization in the crab *Menippe mercenaria*. **Journal of Morphology**., v. 24, p. 147–202, 1993.

BRANDIS, D.; STORCH, V.; TURKAY, M. Morphology and function of the copulatory system in freshwater crabs of the genus *Potamon.* **Journal of Morphology**, v. 239, p. 157-166, 1999.

BRINK, A. M.; MCLAY, L. C. Use of the sterile male technique to investigate sperm compettiton storage, and use in a pill box crab, *Halicarcinus cookii*. (Brachyura: Hymenosamatidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 29, n.1, p. 62–69, 2009.

BRÖSING, A.; RICHTER, S.; SCHOLTZ, G. Phylogenetic analysis of the Brachyura (Crustacea, Decapoda) based on characters of the foregut with establishment of a new taxon. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 45, p. 20-32, 2007.

BROWN, G. G. Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm-egg interaction in the Decapod *Callinectes sapidus*. **Journal of Ultrastructure Research***,* v. 14, p. 425-40, 1966.

DIESEL, R. Discrete Storage of Multiple-Mating Sperm in the Spider Crab *Inachus phalangium*. **Naturwissenschaften,** v. 75, p. 148- 149, 1988.

DIESEL, R. Sperm competition and reproductive success in a decapod *Inachus phalangium* (Majidae): a male ghost spider crab that seals off rivals' sperm. **Journal of Zoology**. v. 220, p. 213-224, 1989.

DULUC, C; SAINTE-MARIE, B.; BRETHES, J. C. Value of indicators for assessing recent mating in brachyuran crabs. ***Journal* of the Marine Biological Association of the United Kingdom,** v. 85, p. 129-135, 2005.

GARCIA-GUERRERO, M.; HENDRICKX, M. E. Embryology of decapod crustaceans I. Embryonic development of the mangrove crabs *Goniopsis pulchra* and *Aratus pisonii* (Decapoda: Brachyura). **Journal of Crustacean Biology**, v. 24, p. 666-672, 2004.

GILBERT S. F. Developmental biology, 8° ed. Sinauer, Sunderland, 2006.

GÓES, J. M. de. 2000. **Biologia do caranguejo *Eriphia gonagra* (Fabricius,1781) (Crustacea, Brachyura, Xanthidae) na região de Ubatuba, São Paulo. 2000.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Zoologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, Brasil, 2000.

GONZÁLEZ-GURRIARÁN, E.; FERNÁNDEZ, L.; FREIRE, J.; MUINO, R. Mating and the role of seminal receptacles in the reproductive biology of the spider crab *Maja squinado*

(Decapoda, Majidae). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 220, p. 269–285, 1998.

GOUDEAU, M. Fertilization in a crab (*Carcinus maenas*). I. Early events in the ovary, and cytological aspects of the acrosome reaction and gamete contacts. **Tissue and Cell**, v. 14, p. 97-112, 1982.

GUINOT, D. Propositions pour une nouvelle classification des Crustacés Décapodes Brachyoures. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences, Série D. Sciences Naturelles**, v. 285, p. 1049–1052, 1977.

GUINOT D. Principes d'une classification évolutive des Crustacés Décapodes Brachyoures. **Bulletin biologique de la France et de la Belgique**, v. 112, p. 211-292, 1978**.**

GUINOT, D.; QUENETTE, G. The spermatheca in podotreme crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Podotremata) and its phylogenetic implications. **Zoosystema,** v. 27, n. 2, p. 267-342, 2005.

GURAYA, S. S. **Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals**.Springer-Verlag, New York, 1897, 429p.

HARTNOLL, R. G. Mating in the Brachyura. **Crustaceana**. n. l6, p. 161- 181, 1969.

HARTNOLL, R. G. Morphology of the genital ducts in female crabs. **Journal of the Linnean Society of London, Zoology**, n. 47, p. 279-300, 1968.

HINSCH, G. W. Penetration of the oocyte envelope by spermatozoa in the spider crab. **Journal of Ultrastructure Research,** v. 35, p. 86-97, 1971.

JAMIESON, B. G. M. Ultrastructure and phylogeny of crustacean spermatozoa. **Memoirs of the Queensland Museum**, v. 31, p. 109–142, 1991.

JAMIESON, B.G.M.; GUINOT, D.; RICHER DE FORGES, B. Phylogeny of the Brachyura (Crustacea: Decapoda): evidence from spermatozoal structure**. Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris**, v. 166, p. 265–283, 1995.

JENSEN, P. C.; ORENSANZ, J. M.; ARMSTRONG, D. A. Structures of the female reproductive tract in the Dungeness Crab (*Cancer magister*) and implications for the mating system. **Biological Bulletin,** v. 190, n. 3, p. 336-349, 1996.

JEYALECTUMIE, C.; SUBRAMONIAM, T. Biochemical composition of seminal secretions with special reference to LDH activity in the reproductive tissues of the field crab, *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). **Experimental Biology**, v. 46, p. 231-236, 1987.

JOHNSON, P. T. **Histology of the blue crab *Callinectes sapidus*: A model for the Decapoda.** Praeger, New York, New York, 1980, 440 p.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia.** Livraria e Editora Santos, São Paulo, 1983, 123p.

LANTEIGNE, C.; BENINGER, P. G.; GIONET. C. Ontogeny of female primary sexual characters in the majid crabs *Chionoecetes opilio* and *Hyas coarctatus*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 16, n. 3, p. 501-514, 1996.

LAUTENSCHLAGER A.; BRANDIS D.; STORCH V. Morphology and function of the reproductive system of representatives of the genus *Uca*. **Journal of Morphology**, v. 271, p. 1281–1299, 2010.

LEE, T., YAMAZAKI, F. Structure and function of a special tissue in the female genital ducts of the Chinese Freshwater crab *Eriocheir sinensis*. **Biological Bulletin**, v. 178, p. 94-100, 1990.

LINHARES, J. C. S. **Estratégias reprodutivas do caranguejo *Ucides cordatus* (Crustacea; Brachyura; Ucididae).** 2010. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, 2010.

LÓPEZ-GRECO, L. S.; FRANSOZO, V.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L.; SANTOS, D. C. Comparative morphology of the seminal receptacles of *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) (Brachyura, Ocypodoidea). **Zootaxa**, v. 2106, p. 41-50, 2009.

LÓPEZ GRECO, L. S.; LÓPEZ, G. C; RODRÍGUEZ, E. M. Morphology of spermathecae in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Grapsidae, Sesarminae). **Journal of Zoology**, v. 249, p. 490–493, 1999.

MARTIN, G. G.; HOSE, J. E. Vascular elemets and blood (hemolymph). In HARRISON, F. W., HUMES, A. G. (Eds). **Microscopic anatomy of invertebrates,** v. 10, Crustacea, Decapoda, Wiley-Liss, New York. p. 117-146, 1992.

MELLÓN, D. Connective tissue and supporting structures. In: TAYLOR; TAYLOR (Eds.). **Microscopic Anatomy of Invertebrates: Decapod, Crustacea**, New York: Wiley-Liss, v. 10. 1992, p. 77-116.

MCLAY, C. L.; LÓPEZ GRECO, L. S. A. hypothesis about the origin of sperm storage in the Eubrachyura, the effects of seminal receptacle structure on mating strategies and the evolution of crab diversity: How did a race to be first become a race to be last? **Zoologischer Anzeiger,** v. 250, p. 378–406, 2011.

MEDINA, A. Structural modifications of sperm from the filddler crab *Uca tangeri* (Decapoda) during early stages of fertilization. **Journal of crustacean Biology**, v. 12, n. 4, p. 610-614, 1992.

MOYANO M. P. S.; GAVIO M. A.; CUARTAS E. I. Morphology and function of the reproductive tract of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea, Brachyura, Majoidea): pattern of sperm storage. **Helgoland Marine Research**, v. 64, p. 213–221, 2010.

NG, P. K. L.; GUINOT, D.; DAVIE, P. J. F. Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. **The Raffles Bulletin of Zoology**. Supplement 17, p. 1-286, 2008.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry Theoretical and Applied,** v, 2. Jet. Churchill Ltda, London, 1960. p. 965.

PINHEIRO. M.; HATTORI, G. Embryology of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura: Ocypodidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 23, p. 729-737, 2003.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROWRELL, L. J. **Histologia: texto e atlas.** 2ª ed. São Paulo: Panamericana. 1993. 766p.

RYAN, E. P. 1967**. Structure and function of the reprductive system of the crab *Portunus sanguinolentus* (Herbst) (Brachyura: Portunidae).** II. The Female system. Proc. Symp. Crustacea Mar. Biol. Asso, India., p. 522-544.

SAINT LAURENT, M. de, Sur la classification et la phylogénie des Crustacés Décapodes brachyoures. II. Heterotremata et Thoracotremata Guinot, 1977. **Comptes rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 290, p. 1317–1320, 1980.

SAINTE-MARIE, B. Sperm demand and allocation in decapod crustaceans. In: Duffy, J.E., Thiel, M. (Eds.), **Evolutionary Ecology of Social and Sexual Systems.** Oxford University Press, New York, 2007, pp. 191–210.

SAINTE-MARIE, G.; SAINTE-MARIE, B. Morphology of the spermatheca, oviduct, intermediate chamber, and vagina of the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 76, p. 1589-1604, 1998.

SAKER, M. M.; ISLAN, M. S.; UEHARA, T. Artificial insemination and early embryonic development of the mangrove crab *Perisesarma bidens (*De Haan) (Crustacea: Brachyura). **Zoological Studies,** v. 48, n. 5, p.607-618, 2009.

SANT'ANNA, B. S.; PINHEIRO, M. A. A.; MATAQUEIRO, M.; ZARA, F. J. Spermathecae of the mangrove crab *Ucides cordatus*: a histological and histochemical view. ***Journal* of the Marine Biological Association of the United Kingdom.** v. 87, p. 903–911, 2007.

SANTHAMMA, K. R.; ADIYODI, R. G. Ovarian growth-related in the spermatheca of the crab *Gecarcinus steniops.* **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 55, n. 4, p 253-260, 1989.

SILVA, J. R. F. **Estudo morfológico em ovários de lagostas do gênero *Panulirus* WHITE 1847, (Decapoda, Palinuridae).** 1999. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1999. 187p.

SOUZA, L. P.; SILVA, J. R. F. Morphology of the female repro- ductive system of the red-clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata* Latreille, 1803). **Scientia Marina**, v. 73, p. 527–539, 2009.

SOUZA, L. P.; SILVA, J. R. F.; ARAUJO, A. M. A., CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphology of the female genital ducts of the blue land crab *Cardisoma guanhumi* (Crustacea: Brachyura: Gecarcinidae). **Acta Zoologica (Stockholm)**, v. 94, p. 300-307, 2013.

SPALDING, J. F. The nature and formation of the spermatophore and spem plug in *Carcinus maenas*. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 83, p. 389-423, 1942.

STERNBERG, R. V.; CUMBERLIDGE, N. On the heterotreme-thoracotreme distinction in the Eubrachyura de Saint Laurent, 1980 (Decapoda, Brachyura). **Crustaceana**, v. 74, n.4, p. 321-338, 2001.

TAYLOR, D. M.; HOOPER, R. G.; ENNIS, G. P. Biological aspects of the spring breeding migration of snow crabs, *Chionoecetes opilio*, in Bonne Bay, Newfoundland (Canada). **Fishery Bulletin**, v. 83, p. 707-710, 1985.

WARNER, G. F. **The biology of crabs.** New York, Elek Science London, 1977, 202 p.

WOLCOTT, D. L.; HOPKINS, C. W. B.; WOLCOTT, T. G. Early events in seminal fluid and sperm storage in the female blue crab *Callinectes sapidus* rathbun: effects of male mating history, male size and, season. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology,** v. 319, p. 43–55, 2005.

XAVIER FILHO, E. S. **Sistema filogenético dos Repstantia (Decapoda: Malascostraca).** Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). 1995. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, 1995.

YAMAGUCHI, T. Incubation of eggs and embryonic development of the fiddler crab, *Uca lactea* (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). **Crustaceana,** v. 74, p. 449-458, 2001

TABLES AND FIGURES

Table 1 - Types of epithelium lining the dorsal region of the seminal receptacles of species of Thoracotremata and Heterotremata.

Species	Family	Epithelium		References
		Simple	Layered	
HETEROTREMATA				
H. coarctatus	Oregoniidae		x	Hartnoll, 1968
C. opilio	Oregoniidae		x	Beninger et al., 1993
L. spinosa	Epialtidae		x	Moyano et al., 2010
C. bocourti	Portunidae		x	Present article
C. danae	Portunidae		x	Shinozaki-Mendes, 2012
P. sanguinolentus	Portunidae		x	Ryan, 1967
C. maenas	Geryonidae		x	Spalding, 1942
Gecarcinucus steniops	Gecarcinucidae	x		Santhamma; Adiyodi, 1989
I. phalangium	Inachidae		x	Diesel, 1989
Cancer magister	Cancridae	x		Jensen, 1996
M. nodifrons	Menippidae	x		Present article
E. gonagra	Eriphiidae		x	Present article
THORACOTREMATA				
U. forcipata	Ocypodidae	x		Lautenschlager et al., 2010
U. tangeri	Ocypodidae	x	x	Lautenschlager et al., 2011
U. ecuadoriensis	Ocypodidae		x	Lautenschlager et al., 2012
U. maracoani	Ocypodidae	x		Present article
P. pisum	Pinnotheridae	x		Becker et al., 2011
P. pectunculi	Pinnotheridae	x		Becker et al., 2012
N. pinnotheres	Pinnotheridae	x		Becker et al., 2013
E. sinensis	Vanuridae	x		Lee; Yamazaki, 1990
C. guanhumi	Gecarcinidae	x		Present article
G. cruentata	Grapsidae	x		Present article
U. cordatus	Ucididae	x		Present article

FIGURE 1

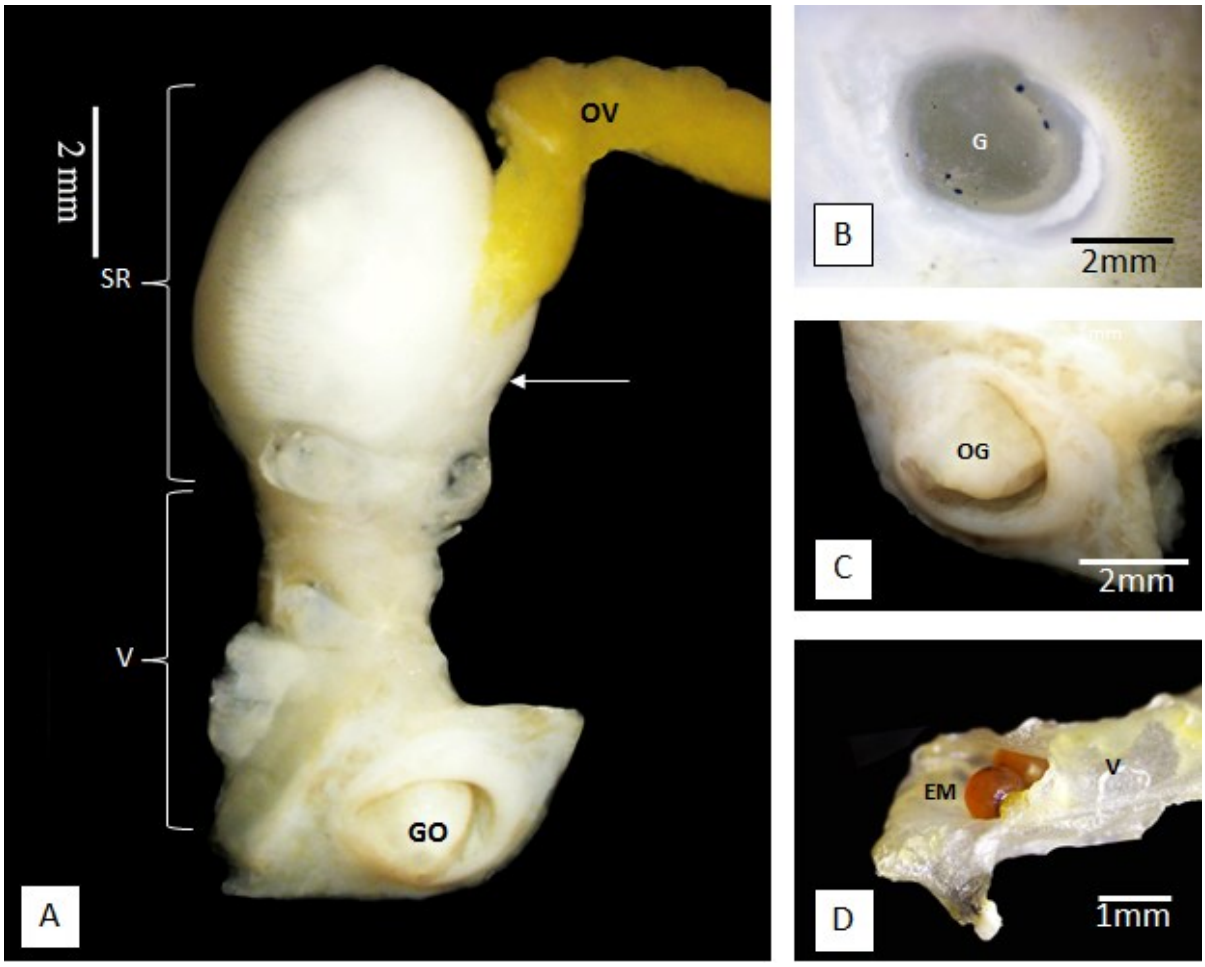

Figure 1 - A) Anatomy of the terminal portion of the female reproductive system in Eubrachyura represented by the species *Cardisoma guanhumi*. Seminal receptacle (SR), ovary (OV), vagina (V), oviduct (arrow) and gonopore (GO); B) Non-operculated gonopore in *Menippe nodifrons* (G); C) Operculated gonopore (OG) in *C. guanhumi*; D) Vagina of *E. gonagra* containing embryo (EM) (Figures A and C: adapted from Souza et al., 2013) .

FIGURE 2

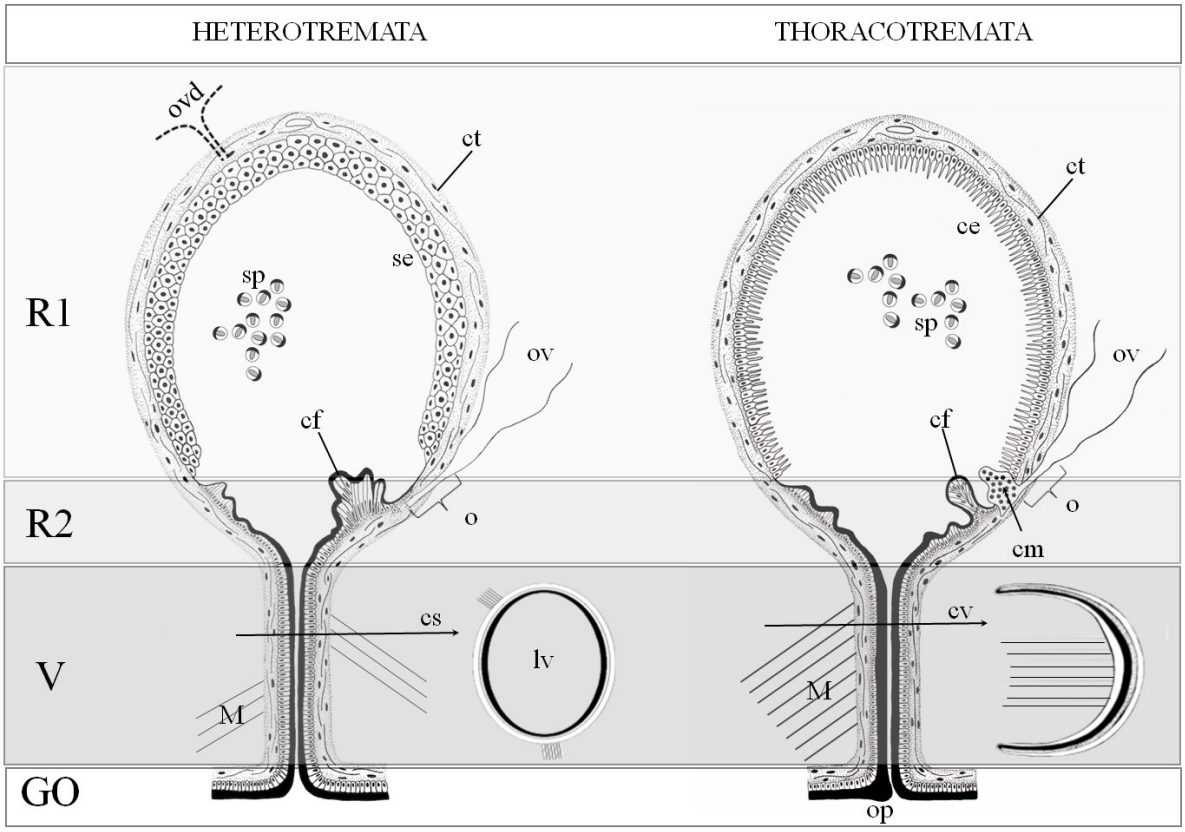

Figure 2 - Schematic illustration of the major structures of the female genital ducts in Heterotremata and Thoracotremata. Mid-dorsal secretory region of seminal receptacle (R1); Ventral region lined internally by cuticle (R2); Vagina (V); Genital opening (GO); Cross-section of the simple vagina in Heterotremata (cs arrow); Cross-section of the concave vagina in Thoracotremata (cv arrow). In this taxon, the genital opening is operculated (op); Connective tissue (ct); Columnar epithelium (ce); stratified epithelium (se); Cell mass (cm); Cuticular folds (cf); Oviduct (o); Ovary (ov); Striated muscle (M); Operculum (op); Spematozoa (sp). In some heterotreme species the oviduct is connected dorsally (ovd) (Illustration by Jessica Alves Oliveira Pereira).

FIGURE 3

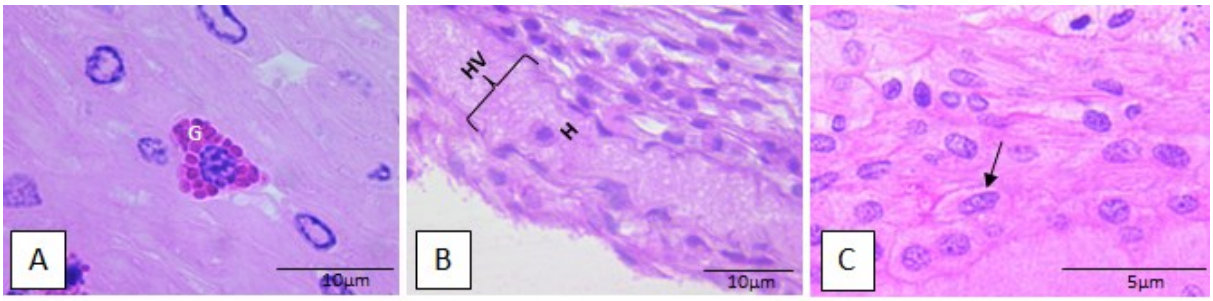

Figure 3 - Cell types observed in the connective tissue of the seminal receptacle in Eubrachyura. A) Granulocytes (G) with cytoplasm containing eosinophilic granules; B) Hyaline hemocytes (H), also observed inside the hemal vessels (HV); C) Myofibroblasts (arrow). Species illustrated: A) *U.cordatus*; B) *G. cruentata*; C) *E. gonagra*. Stained with hematoxylin-eosin.

FIGURE 4

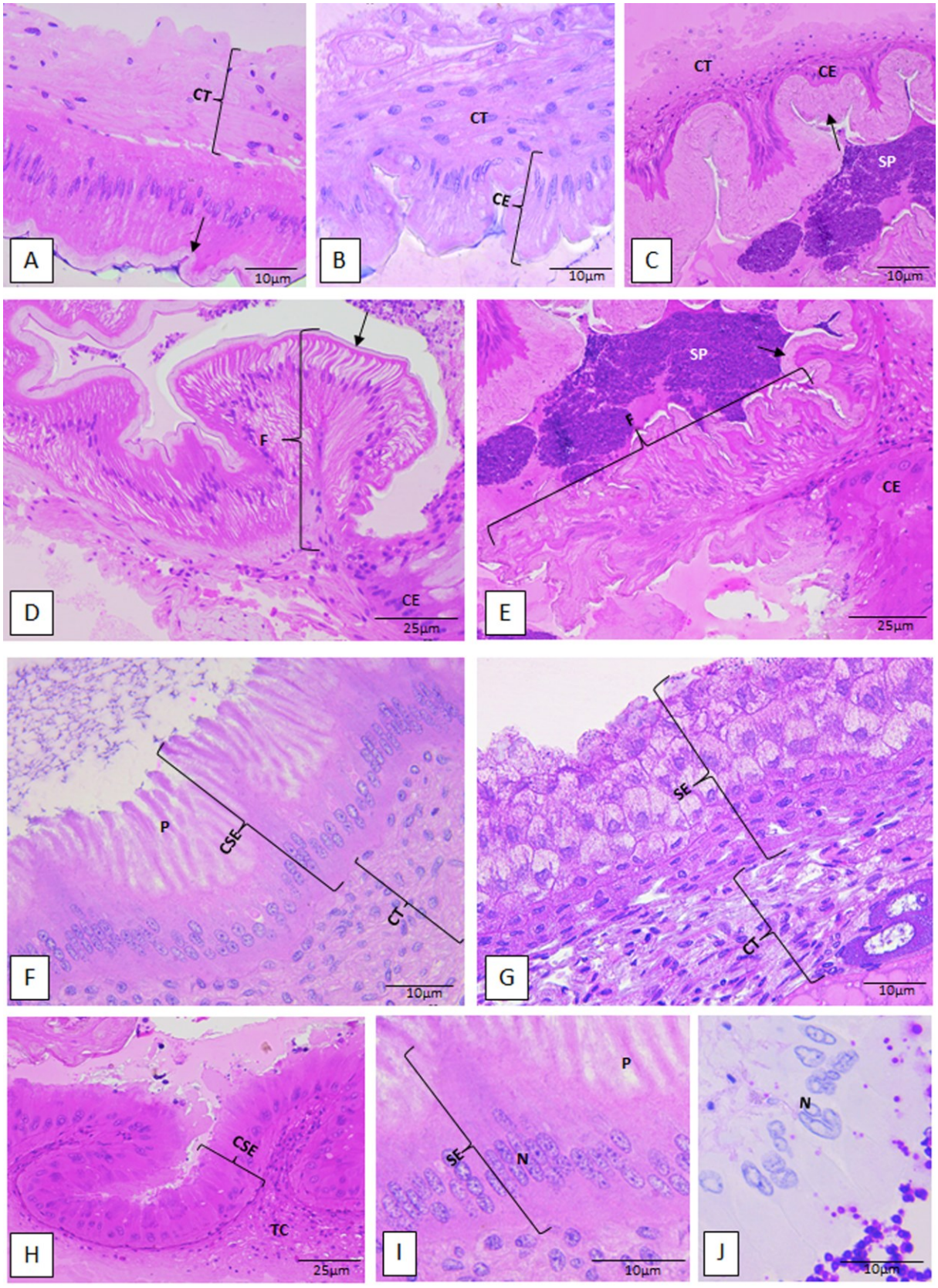
A
CT
10µm
B
CT
CE
10µm
C
CT
CE
SP
10µm
D
F
CE
25µm
E
SP
F
CE
25µm
F
P
CSE
CT
10µm
G
SE
CT
10µm
H
CSE
TC
25µm
I
P
SE
N
10µm
J
N
10µm

Figure 4 - Photomicrographs of different types of epithelium in the seminal receptacle in Eubrachyura. A) Columnar epithelium lined internally by cuticular intima (arrow) in the ventral region of the seminal receptacle of *G. cruentata*. Connective tissue (CT); B and C) Columnar epithelium (CE) on the ventral surface of the seminal receptacle of *U. maracoani* and *M. nodifrons*, respectively in a convoluted layer and with cuticular intima of varying thickness (arrow). D) Folds (F) resulting from the invagination and thickening of the epithelium at the point of transition between the ventral and the mid-dorsal aspect of the seminal receptacle. E) Pronounced cuticular folds in *M. nodifrons.* Spermatozoa (SP); F) Columnar secretory epithelium (CSE) in the mid-dorsal region of the seminal receptacle in Thoracotremata, represented by *G. cruentata*, with visible projections (P) from the apical surface of the cells; G) Stratified epithelium (STE) in the mid-dorsal portion of the seminal receptacle in Heterotremata represented by *E. gonagra*. H) Convoluted secretory epithelium (CSE) in *M. nodifrons*; I) Secretory epithelium (SE) in *G. cruentata* with cells appearing to contain several nuclei (N); J) Secretory epithelium of *G. cruentata* with rather convoluted cell nuclei (N). Figures A-I: stained with hematoxylin-eosin; Figure J: stained with PAS.

FIGURE 5

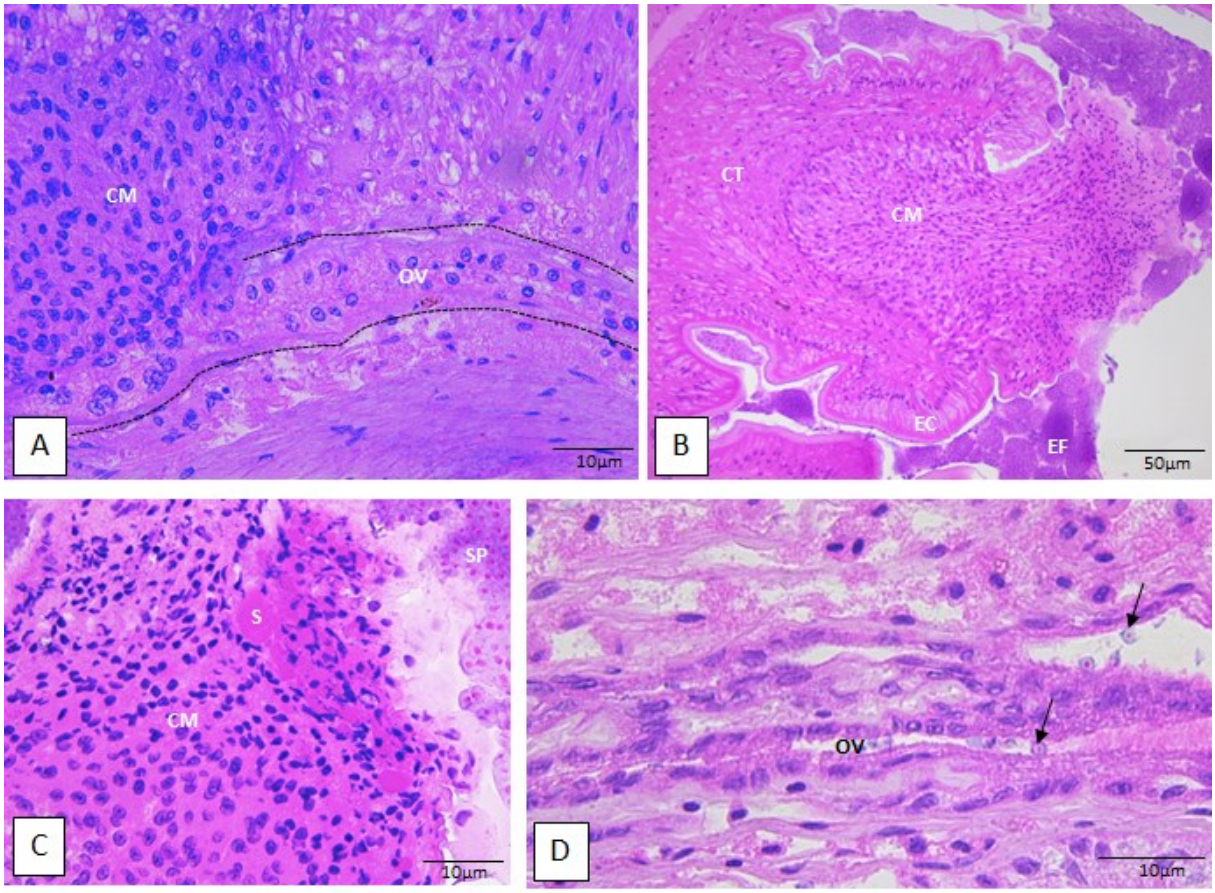

Figure 5 - A) Photomicrograph of cell mass (CM) at the site of connection between the oviduct (OV) and the seminal receptacle in Thoracotremata (represented by *U. maracoani*); B) Cell mass (CM) projecting towards the lumen of the seminal receptacle in Thoracotremata (represented by *U. cordatus*). Connective tissue (CT), spermatozoa (SP). C) Luminal portion of cell mass with denerating cells and release of secretion (S) in *U. cordatus*; D) Oviduct (OV) lined by simple pavement epithelium in *E. gonagra*, with spermatozoa inside (arrow). Stained with hematoxylin-eosin.

FIGURE 6

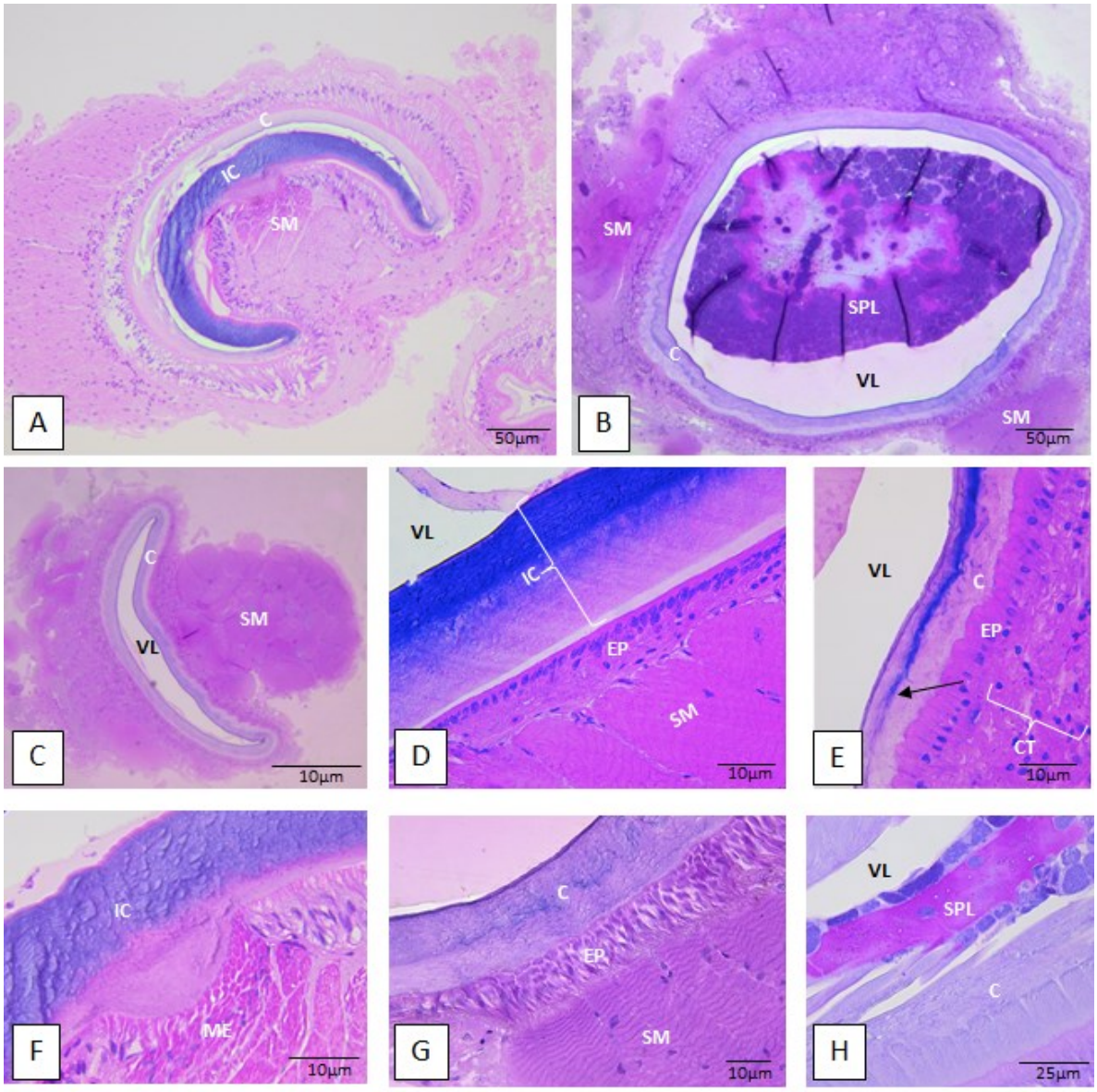
A
C
IC
SM
50µm
B
SM
SPL
C
VL
SM
50µm
C
C
SM
VL
10µm
D
VL
IC
EP
SM
10µm
E
VL
C
EP
CT
10µm
F
IC
ME
10µm
G
C
EP
SM
10µm
H
VL
SPL
C
25µm

Figure 6 - Photomicrograph of the vagina in Eubrachyura. A) Cross-section of concave vagina in Thoracotremata represented by the species *G. cruentata*. Note difference in the reaction to HE between the basophilic invaginated portion (IC), the external eosinophilic portion (C) and the striated muscles (SM) attached to the vagina on one side only; B) Cross-section of vagina in Heterotremata represented by the species *E. gonagra*. Note the striated muscles (SM) attached at different points of the vagina. Cuticle (C); Vaginal lumen (VL) and sperm plug (SPL); C) Terminal aspect of the vagina in Heterotremata (represented by *M. nodifrons*) with slight concavity; D) Cuticle of the invaginated aspect (IC) of the vagina with an eosinophilic-basophilic gradient between the basal portion and the luminal portion; E) Site of transition between the vagina and the seminal receptacle in Thoracotremata represented by the species *U. maracoani*. Note differences in the reaction to staining of the cuticle (C) with hematoxylin-eosin (arrow); F) Point of attachment of striated muscles to the vagina in Thoracotremata. Note protuberances due to cuticle thickening; G) Point of attachment of muscles to the vagina in Heterotremata, showing thickened epithelium (EP); H) Longitudinal section of the vagina of *E. gonagra* with visible sperm plug (SPL) inside the vaginal lumen (VL). Stained with hematoxylin-eosin.

FIGURE 7

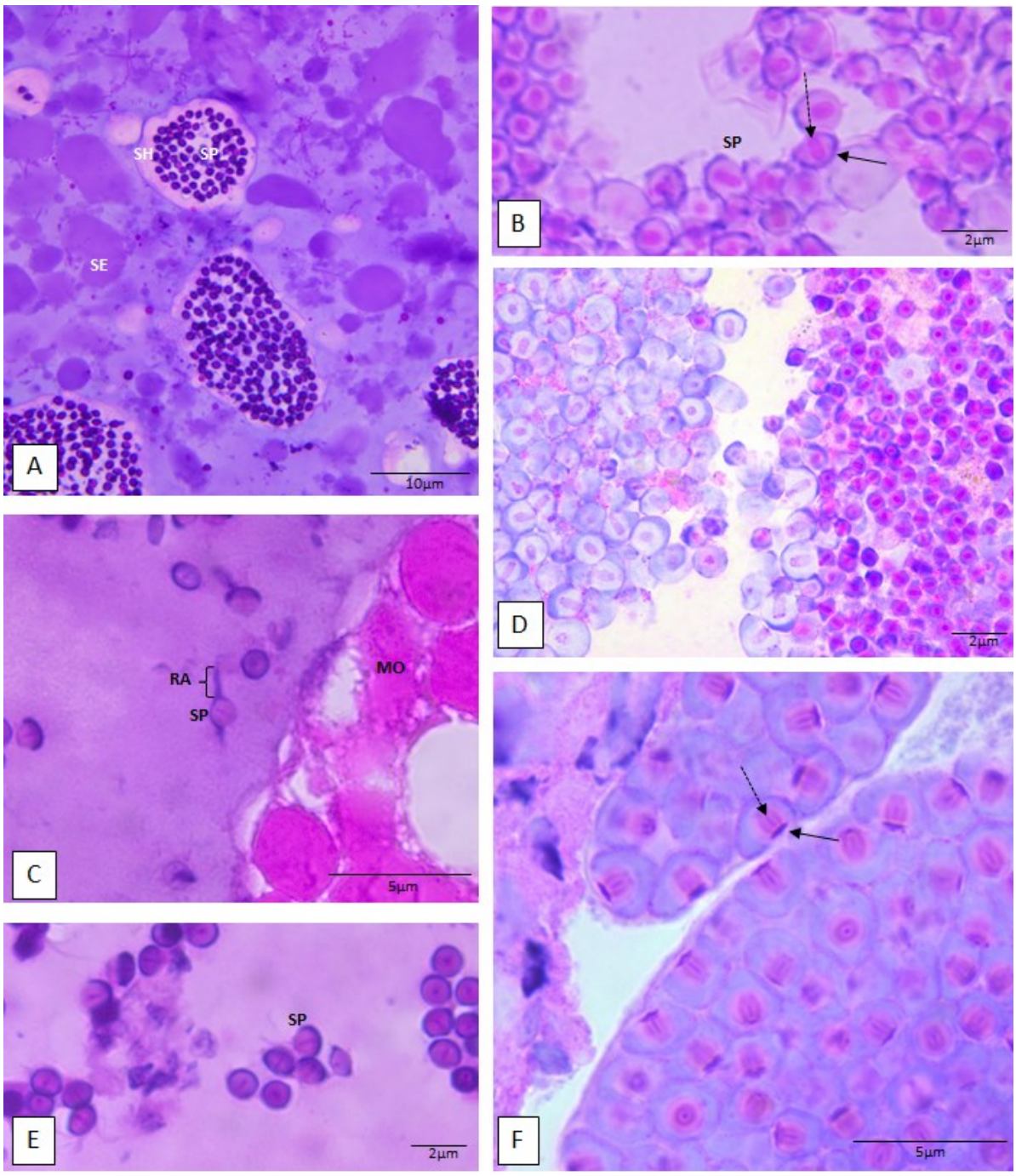

Figure 7 - Photomicrograph of spermatozoa inside the seminal receptacle in Eubrachyura. A) Spermatozoa (SP) in a protective sac, forming spermatophores (SH). Secretion (SE); B) Spermatozoa with acrosome (arrow) and region of the eosinophilic perforatorium (dotted arrow); C) Spermatozoa (SP) surrounding mature oocytes (MO) inside the seminal receptacle of *G. cruentata*. Note well-developed raidal arms (RA) evidenced by strong basophilia; D) Photomicrograph of spermatozoa at different stages inside the seminal receptacle of *E. gonagra*; E) Spermatozoa (SP) inside the seminal receptacle of *G. cruentata*. Note the poorly developed radial arms of the spermatozoa farther away from the mature oocytes; F) Not fully developed spermatozoa inside the seminal receptacle of *U. cordatus*. Early-stage acrosome (arrow) and perforatorium (dotted arrow). Stained with hematoxylin-eosin.

FIGURE 8

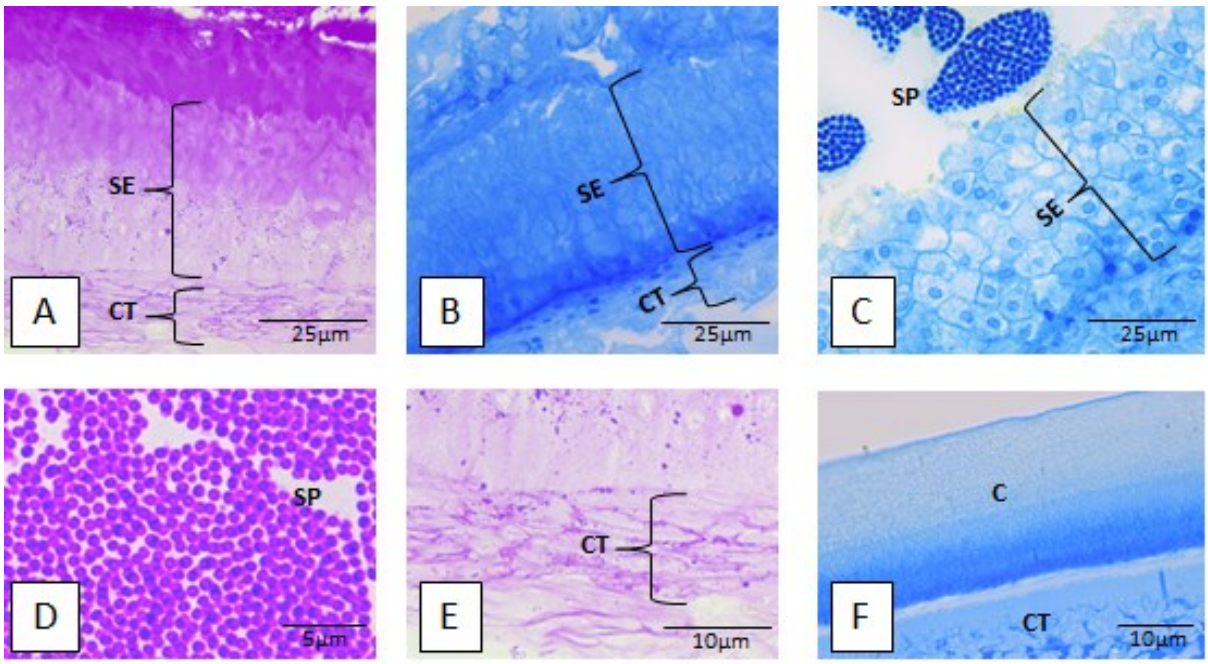

Figure 8 - Photomicrograph of histochemical evaluation of the seminal receptacle in Eubrachyura. A) Dorsal region of the seminal receptacle of *G. cruentata* showing a high concentration of polysaccharides on the apical surface of the secretory epithelium (SE). Connective tissue (CT); B) Dorsal aspect of the seminal receptacle of *C. guanhumi* showing intense reaction of the secretory epithelium to staining with bromophenol blue; C) Seminal receptacle of *E. gonagra* showing a high concentration of proteins in the spermatozoa (SP) and a moderate concentration in the stratified epithelium (SE); D) Spermatozoa with high concentration of polysaccharides; E) Connective fibers (CT) lining the seminal receptacle of *G. cruentata* showing intense reaction to staining with PAS; F) Invaginated portion of the cuticle (C) revealing gradient when stained with bromophenol blue. Figures A and D: stained with PAS; Figures B, C and F: stained with bromophenol blue.

CAPÍTULO 2

CAPÍTULO 2

TÍTULO: MORFOLOGIA COMPARADA DOS GONÓPODOS E MECANISMO DE TRANSFERÊNCIA DE ESPERMATOZÓIDES EM EUBRACHYURA (SAINT LAURENT, 1980) (CRUSTACEA: DECAPODA: BRACHYURA)

TITLE: COMPARATIVE MORPHOLOGY OF GONOPODS AND SPERMATOZOA TRANSFERENCE MECHANISM IN EUBRACHYURA (SAINT LAURENT, 1980) (CRUSTACEA: DECAPODA: BRACHYURA)

RESUMO

A estrutura dos gonópodos, bem como aquelas cuticulares associadas a eles, foram pouco descrita para Brachyura, embora sejam de particular interesse para este táxon, por serem morfologicamente diversas, provendo importantes informações taxonômicas. O presente trabalho teve como objetivo descrever os gonópodos de caranguejos Eubrachyura, enfatizando as diversas alterações cuticulares presentes em sua superfície e propondo inferências a respeito de suas funções. Foram coletados machos representantes de diferentes famílias de caranguejos Heterotremata e de Thoracotremata. Os animais foram transportados para o laboratório, onde foram dissecados e os gonópodos retirados, fixados e processados para análise sob microscopia eletrônica de varredura. Em todas as espécies analisadas, observou-se que o sistema copulatório de caranguejos Eubrachyura é formado por dois pares de gonópodos, constituídos por dois segmentos, um basal e largo – protopodito; e um distal e alongado – o endopodito. O primeiro par de gonópodo é alongado e possui invaginação longitudinal da cutícula, formando um ducto. Este tem como função transportar os espermatozóides inseridos em uma abertura basal até a porção distal do gonópodo, de onde serão transferidos para o ducto genital feminino. O segundo gonópodo se insere no ducto ejaculatório do primeiro gonópodo, funcionando como um pistão, bombeando os espermatozóides para a região distal. Em Thoracotremata observou-se a presença de uma projeção cuticular que atua como um mecanismo do tipo chave-fechadura. Foi possível constatar a presença de cinco tipos de setas distribuídos nos gonópodos, que dependendo do tipo e da localização, podem atuar na quimio, mecanorecepção, proteção e na filtragem de partículas que possam dificultar o fluxo de espermatozóides no ducto ejaculatório.

Palavras-chaves: Eubrachyura, sistema copulatório, setas.

ABSTRACT

The structure of gonopods, as well as the cuticular structures associated to them, were little described for Brachyura, although those are of particular interest in this taxon for being morphologically diverse, promoting important taxonomic information. The present research aimed to describe the gonopod of Eubrachyura crabs, emphasizing the many cuticular projetions present in its surface and proposing inferences about its functions. Males from different crab families of Heterotremata and Thoracotremata were collected. The animals were transported to the lab, where they were dissected and had their gonopods removed, fixated and processed for analysis under scanning electron microscope. In all analyzed species, it was observed that the copulatory system of Eubrachyura crabs is formed by two pairs of gonopods, constituted by two segments, one basal and wide – protopodite; and one distal and elongated – endopodite. The first pair of gonopod is elongated and has longitudinal invagination of cuticle, shaping up into a duct. Its function in to transport spermatozoa inserted in a proximal opening until the gonopod distal region, from where sperm will be transferred to the female genital duct. The second gonopod is inserted in the first gonopod's ejaculatory canal, acting like a piston, bombing spermatozoa to the distal region. In Thoracotremata it was observed the presence of a cuticular projection that acts like a key-locker mechanism. It was possible to verify the presence of five types of setae distributed in the gonopods, which can be involved in protection, chemo and mechanoreception; and filtering of particles that can raise difficulties to the spermatozoa flux in the ejaculatory canal.

Keywords: Eubrachyura, copulatory system, setae.

1. INTRODUCTION

The Brachyura taxon can be divided in three groups based on the location of male and female genital orifices: the Podotremata, presenting a basal condition of coxal orifices; the Heterotremata, including families in which the male genital orifice is coxal and the female is sternal; and the Thoracotremata, with derived condition families, in which genital orifices are located in the sternum in both sexes (GUINOT, 1977; 1978). Saint Laurent (1980) includes Heterotremata and Thoracotremata as sister groups in a taxon denominated Eubrachyura.

In Brachyura, spermatozoa are not transferred to the females freely through fluid, but through a protector envelope, formed by secretions produced in the male reproductive tract (KROL et al., 1992). The typical Decapoda spermatozoa possess a central zone encircled by immovable arms, and there is no intermediate piece or flagellum (ADIYODI; SUBRAMONIAM, 1983). Brachyura spermatozoa are immobile, and therefore the success of mating depends on the precise insertion of those in the female reproductive system. Thus, spermatophore transference to the female is made through the action of the first and second pair of pleopods (gonopods), modified to act as a copulatory organ (HARTNOLL, 1969). To assure fertilization success, an optimized interaction of gonopods with female genital orifices is essential. A penis papilla extends from the terminal portion of the deferens vas, introducing the seminal liquid into the base of the first pair of gonopods. The second pair of gonopods

would function as a piston that would bomb the spermatophoric mass inserted in the first appendix to the seminal receptacle (BAUER, 1986).

Both gonopods present in its surface cuticular specializations. According to Garm (2004), these structures can vary in shape and size considerably, and are responsible for the interaction between the animal and the external environment. A great part of these structures consist in elongated and base-articulated projections, which receive diverse terms, including sensillas, "hairs" or setae. This last term is the most frequently used (GARM, 2004). The setae present a large variety of morphologic types and distribution patterns throughout the appendix surface, posing as a challenge to the elaboration of classification systems which come to include a whole diversity of microstructures present in crustaceans' cuticular surface. Such system was suggested by Thomas (1970), Watling (1989), Farmer (1974) and Garm (2004).

The structure of gonopods, as well as those of cuticular structures associated to them, was little described for Brachyura (SPALDING, 1942; MARTIN; ABELE, 1986; BENINGER et al., 1991; BRANDIS et al., 1999; TSUCHIDA; FUJIKURA, 2000; MOYANO et al., 2011; LAUTENSCHLAGER et al., 2010; BECKER et al., 2012). In some species, gonopods are considered an important parameter of crab maturity study, since those appendix go through morphologic modifications when the male is sexually mature. In this way, acquiring results on gonopods morphology would be an important tool to establish management plans of commercial and threatened species (BENINGER et al., 1991; LEITE, 2005; LIRA, 2012). Considering all exposed information, the present research aimed to describe the gonopods of some Eubrachyura crab species, emphasizing the different types of cuticular structures present in its surface and proposing inferences about its functions.

2. MATERIALS AND METHODS

Representatives of Heterotremata families were collected: Eriphiidea (*Eriphia gonagra*), Menippidae (*Mennipie nodifrons*) and Portunidae (*Callinectes bocourti*); of Thoracotremata Grapsidae (*Goniopsis cruentata*); Gecarcinidae (*Cardisoma guanhumi*); Ocypodidae (*Uca maracoani*), Ucididae (*Ucides cordatus*). These were collected during 2010 and 2013 on Pacheco beach, Ceará, Brazil (3°41'S; 38°37'O) and on the Jaguaribe River estuary, Ceará (4°30'S; 37°46'O). Authorization for capture and transportation was granted by

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio – process n° 24180-3). Five males of each species were captured.

The collected animals were transported in water-filled recipients to the laboratory where they were cold-anaesthetized for approximately 15 minutes. Next, the cephalothorax width was measured, for posterior dissection and removal of gonopods. These were fixated in Glutaraldehyde 2,5% in Cacodilate buffer solution (0,1M), dehydrated in crescent acetone concentrations (70-100%) for 10 minutes each, taken to critical point drying, placed in aluminum support, where they received gold coating, and afterwards were examined under scanning electronic microscope (SEM) (Hitachi – TM3000). The setae of some gonopods were removed with a razor and analyzed under stereomicroscope.

In muddy environment species *Goniopsis cruentata, Cardisoma guanhumi, Uca maracoani* e *Ucides cordatus*, before dehydration, the gonopods were submitted to 15 minutes in ultrasound and cleaned with a brush to remove any detritus that could raise difficulties in the analysis and registration of structures under the SEM. As description criteria, the standard position adopted was with the abdomen flexed under the cephalothoracic region. In this way, the gonopod side facing the sternum is denominated sternal region and the one facing the abdomen is the abdominal region. In the present study, the terminology used as reference was the one suggested by Garm (2004) and Thomas (1970) for the structures and projections present in the cuticle, as well as the classification for the different types of setae.

3. RESULTS

In all the analyzed species, it was observed that the Eubrachyura copulatory system consists of two pairs of gonopods. These are formed by two segments, one basal and wide – protopodite; and one distal and elongated – endopodite (Fig. 1).

3.1. First Gonopod

The first gonopod is always elongated, generally larger than the second, except in Heterotremata *E. gonagra* and *M. nodifrons*, in which the second gonopod is a little bigger than the first. The endopodite presents cylindrical form (Heterotremata *E. gonagra, C. bocourti*) or partially flattened (Heterotremata *M. nodifrons*; Thoracotremata *U. cordatus, G. cruentata, C. guanhumi, U. maracoani*). Throughout its axis, the first gonopods are little curved, accentuating in the terminal portion. In Heterotremata this curving is orientated to the central region, while in Thoracotremata the first gonopod presents itself curved in sternal direction, and the distal portion is rotated to the cephalothorax lateral region (Fig. 1). When

the gonopores of females of the respective species were analyzed, it was observed that those presented themselves orientated to allow fitting in the final portion of the first gonopod.

In all species the endopodite of the first gonopod presents a cuticle invagination that extends longitudinally, forming a duct – the ejaculatory canal (Fig. 2A; E; G). This invagination is initiated in a proximal opening (Fig. 2B) and ends in another located in the terminal region (Fig. 2C; E; F; G). In Thoracotremata, this terminal opening is not easily visualized due to the presence of elongated projections (setae) in great quantities inserted in the gonopod terminal portion (Fig. 2D). Unlike analyzed Heterotremata, which have fewer and smaller setae distributed around the gonopod axis (Fig. 2E; F; G).

The terminal region of the first gonopods presents significant differences between species, especially when Heterotremata and Thoracotremata are compared. In *C. bocourti* and *E. gonagra* this terminal region is funnel-shaped, being less accentuated in *M. nodifrons* (Fig. 2E; F; G). In Thoracotremata, this region is flared and presents a great quantity of setae (Fig. 2D). Under the stereomicroscope, a brown-colored projection can be observed, emerging in the terminal portion (Fig. 3 A; B). In *C. guanhumi* this projection is quite elongated, has serrated border and a distal opening of the ejaculatory canal (Fig. 2H; I). When sectioned transversally with a razor, it is possible to see the ejaculatory canal lumen in this projection (Fig. 3C). In *U. cordatus* and *G. cruentata*, this projection is small and of difficult visualization, since it is covered by setae (Fig. 3A). Under the stereomicroscope, after the removal of setae with a razor, it was also possible to observe the presence of the ejaculatory canal terminal opening (Fig. 3D). In *U. maracoani* this structure is well visible. However, it was not possible to observe the presence of a terminal opening (Fig. 3B).

3.2. Second Gonopod

The second gonopod, like the first, is also comprised of an elongated endopodite, without invagination forming the ejaculatory canal. The second gonopod's endopodite can vary in size between species, being short in Thoracotremata and in *C. bocourti* Portunideo. In *M. nodifrons* and *E. gonagra*, it is long and a little bigger than the first gonopod. The proximal region of the second gonopods presents setae agglomeration (Fig. 4F). During dissection of species with short second gonopods, it was observed that these were generally inserted in the proximal opening of the first gonopod.

In Thoracotremata, the abdominal side of the second pair of gonopods presents itself longitudinally folded surface (Fig. 4C). The terminal portion of gonopods in this group

presents a circular border, with one of these elongated in an apical expansion to form the appendix masculina. This structure has a similar form among Thoracotremata. However, it differs in size, texture and distribution of cuticular projections present in its surface (Fig. 4A; B). In *C. guanhumi* and *U. maracoani*, the internal surface of the appendix masculina is covered by little flattened and pointed projections – denticules (Fig. 4G). In *U. maracoani*, a small curved filament is observed in the extremity of those denticules (Fig. 4H). In *U.cordatus* the internal surface of the appendix masculina does not present denticules. However, some longitudinal folds are observed (Fig. 4D). In the external surface, there are many folds with denticules (Fig. 4E). The circular border, opposed to the appendix masculine of the second gonopods, presents rugose surface, with some denticules (Fig. 4G). In *C. bocourti* besides the appendix masculina, another extension in the second gonopod terminal portion is observed (Fig. 5A). In this species, the appendix masculina is covered internally and in its borders with many robust projections (Fig. 5B).

In Heterotremata *E. gonagra* e *M. nodifrons*, the second gonopods' terminal portion is elongated and sharpened and does not present an evident appendix masculina (Fig. 5C; D). In the abdominal side of the subterminal region, it is possible to observe the presence of elongated projections covered with denticules that encircle the gonopod of *E. gonagra* encircle partially and the gonopod of *M. nodifrons* in crescent shape (Fig. 5E; F; G). These projections are in direction of the gonopod's terminal region. In *M. nodifrons*, in the sternal side to these projections, there is a dent that partially encircles the gonopod, probably to allow the flexion of its terminal region, and it is possible to observe in the subterminal region of this species a protuberance with a surface covered in denticules groupings (Fig. 5F; H). In all species, denticules in the second gonopod were orientated to the distal region.

3.3. Setae – types and distribution

Five types of setae distributed in Eubrachyra gonopods surface were classified in the following manner: simple, pappose, papposerrate (classification by GARM, 2004), conate (classification by THOMAS, 1970) and paddleform.

a) Simple: these are setae with variable length and thickness, of cylindrical form or in some cases flattened on the sides (Fig. 6A; E; F). These setae do not show subdivisions or cuticular projections, except in *E. gonagra*, with denticules in the setae's subterminal region (Fig. 6D). In all species, this type of seta presented a ringed gonopod insertion in the cuticle (Fig. 6B) and a ring formation encircling the seta's stem generally near its mediated portion – the annulus (Fig. 6C).

In Thoracotremata, simple setae are present mainly in the first gonopod's distal region, where they present different sizes and are oriented to the terminal region. In the Heterotremata *E. gonagra* these setae are located subterminally, and in the internal lateral border groupings of mainly large simple setae are observed, while the ones in the opposite side are small (Fig. 6A; 2B). In *M. nodifrons* simple setae are observed in the terminal and medium portion, unlike other species. In this one, a large number of setae are orientated to the first gonopod's proximal portion, with some small and sharpened simple setae turned to the opposite region (Fig. 2E; 6F). In *C. bocourti* these setae are small and in smaller number.

b) Papposa: this type also presents a ringed insertion in the gonopod, are very elongated and thin (Fig. 7A; B). Its main characteristic is the presence of projections that are elongated, flattened and with serrated borders – the setules. These are inserted in the cuticle, distributed randomly across the whole setae and are projected to the terminal portion (Fig. 7C; D). The annulus present in the setae main stem is hardly observed due to the great quantity of setules distributed in its stem.

This type of setae is observed mainly in the first and second gonopods' proximal region in all species. In the first gonopod it is visualized forming agglomerates in the proximal opening (Fig. 2B; 4F) and across the medium portion of the first gonopod, but in smaller number and size.

c) Papposerrate: are elongated and thin, with a ringed insertion, and present a medium and proximal portion with randomly distributed setules. The distal portion has denticules distributed across its borders (Fig. 7F; G). This type of setae was visualized in the first and second gonopod of *C. guanhumi*, but in small number in the gonopods' proximal and medium region.

d) Conate: a short and robust seta, with a ringed insertion in the cuticle. The annulus can be visualized in the medium portion (Fig. 8C). They were only observed in the first gonopods' medium portion of *C. bocourti*.

e) Paddleform: it is shaped like a paddle and turned to the proximal region of the gonopod. These setae present a central annulus with an insertion also in a ringed dimple (Fig. 8A; B). It was only observed in *C. bocourti*, distributed in the external terminal and lateral portion of the first gonopod.

The setules are limited to the stem of pappose and papposerrate setae. However, as it was said before, the denticules were also observed in the gonopods surface, being present

mainly in the terminal region of the second gonopods of Thoracotremata and in *E. gonagra*. They are also present in the first gonopods of *M. nodifrons* and *E. gonagra*.

FIGURES

FIGURE 1

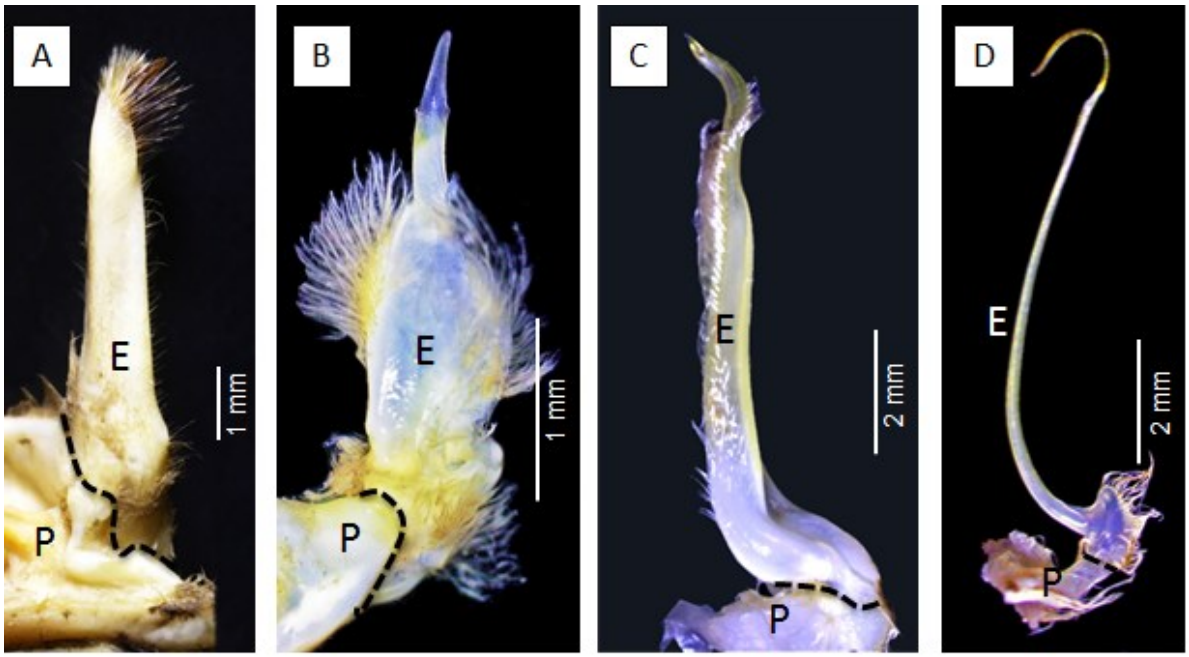

Figure 1 - Gonopods in Eubrachyura crabs photographed using stereomicroscope. Note the size difference between the first and second gonopod in Thoracotremata and Heterotremata. First (A) and second (B) gonopod of *C. guanhumi*, a Thoracotremata. First (C) and second (D) gonopod of *E. gonagra*, a Heterotremata. The dotted line shows the approximated division point between endopodite (E) and protopodite (P).

FIGURE 2

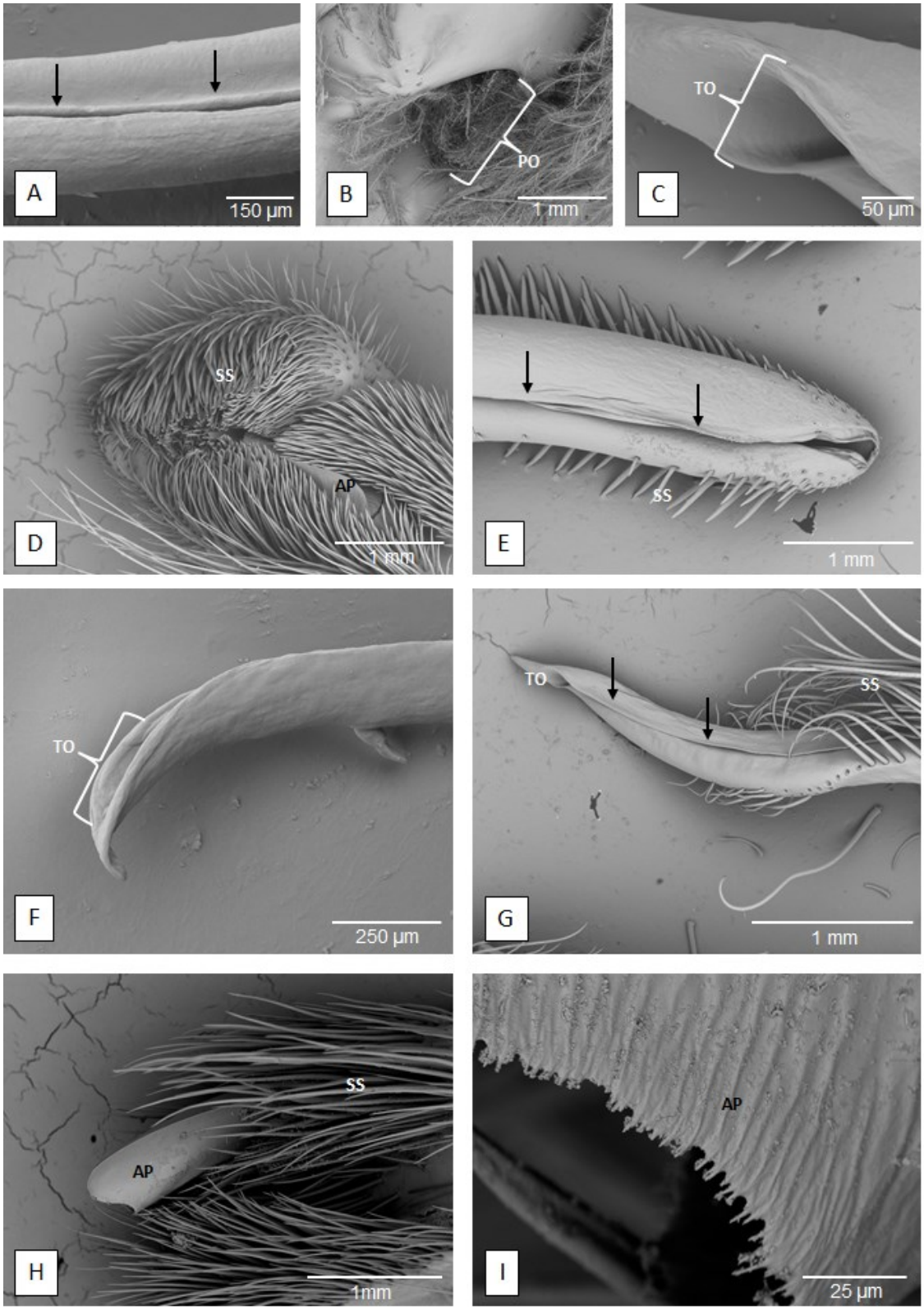
A
150 µm
B
PO
1 mm
C
TO
50 µm
D
SS
AP
1 mm
E
SS
1 mm
F
TO
250 µm
G
TO
SS
1 mm
H
SS
AP
1mm
I
AP
25 µm

Figure 2 – Scanning electromicrographies of Eubrachyura crabs' first gonopod. A) Invaginated surface forming the ejaculatory canal (arrows); B) Proximal opening (PO) of the ejaculatory canal; C) Terminal opening (TO) of the ejaculatory canal; D) Distal region of the first gonopod in Thoracotremata *U. cordatus*. Simple setae (SS); Apical projection (AP); E) Terminal portion in Heterotremata *M. nodifrons* evincing the ejaculatory canal (arrows); F) Terminal opening in *C. bocourti*; G) Ejaculatory canal and terminal opening in *E. gonagra*; H) Apical projection (AP) in *C. guanhumi*; I) Detail of the apical projection in *C. guanhumi* evincing the serrated border. Species in A, B and C - *C. bocourti*.

FIGURE 3

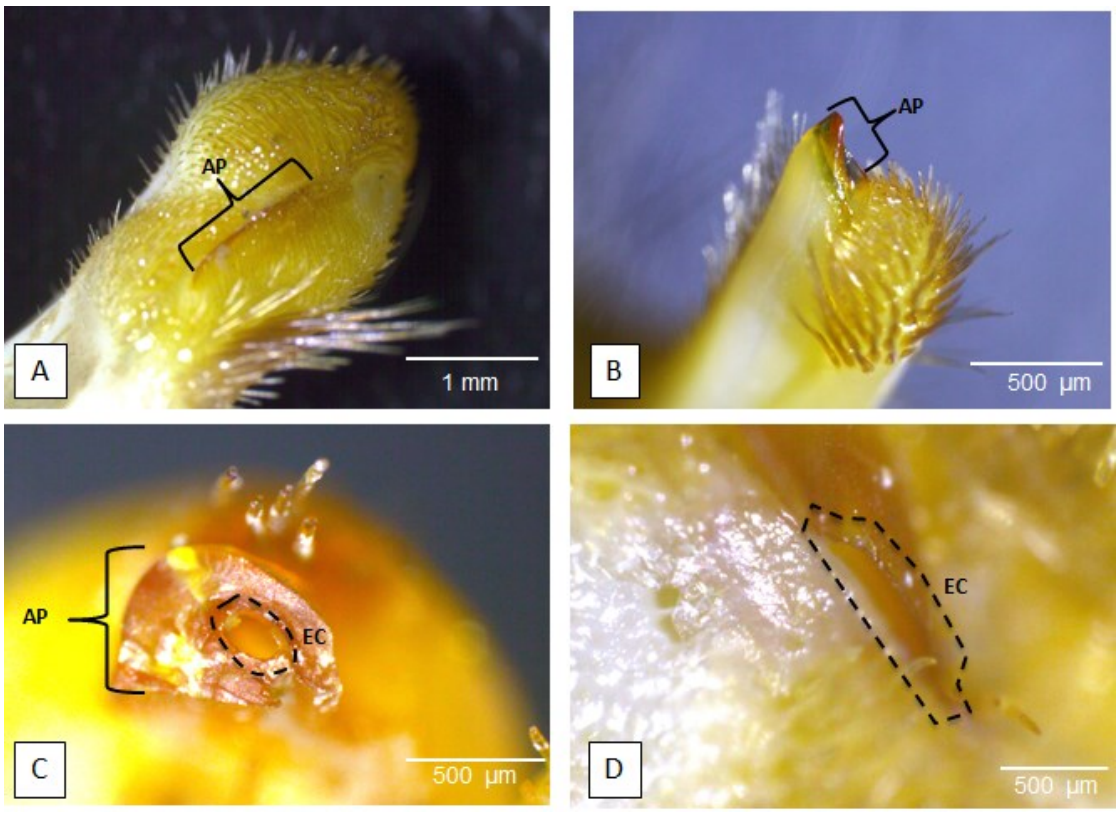

Figure 3 – Terminal region of the first gonopod in Thoracotremata crabs photographed using stereomicroscope. A) Apical projection (AP) in *U. cordatus*; B) Apical projection clearly evident in *U. maracoani*; C) Transversal section of apical projection in *C. guanhumi* evidencing the ejaculatory canal (EC); D) Opening of the ejaculatory canal present in the apical projection in *U. cordatus*.

FIGURE 4

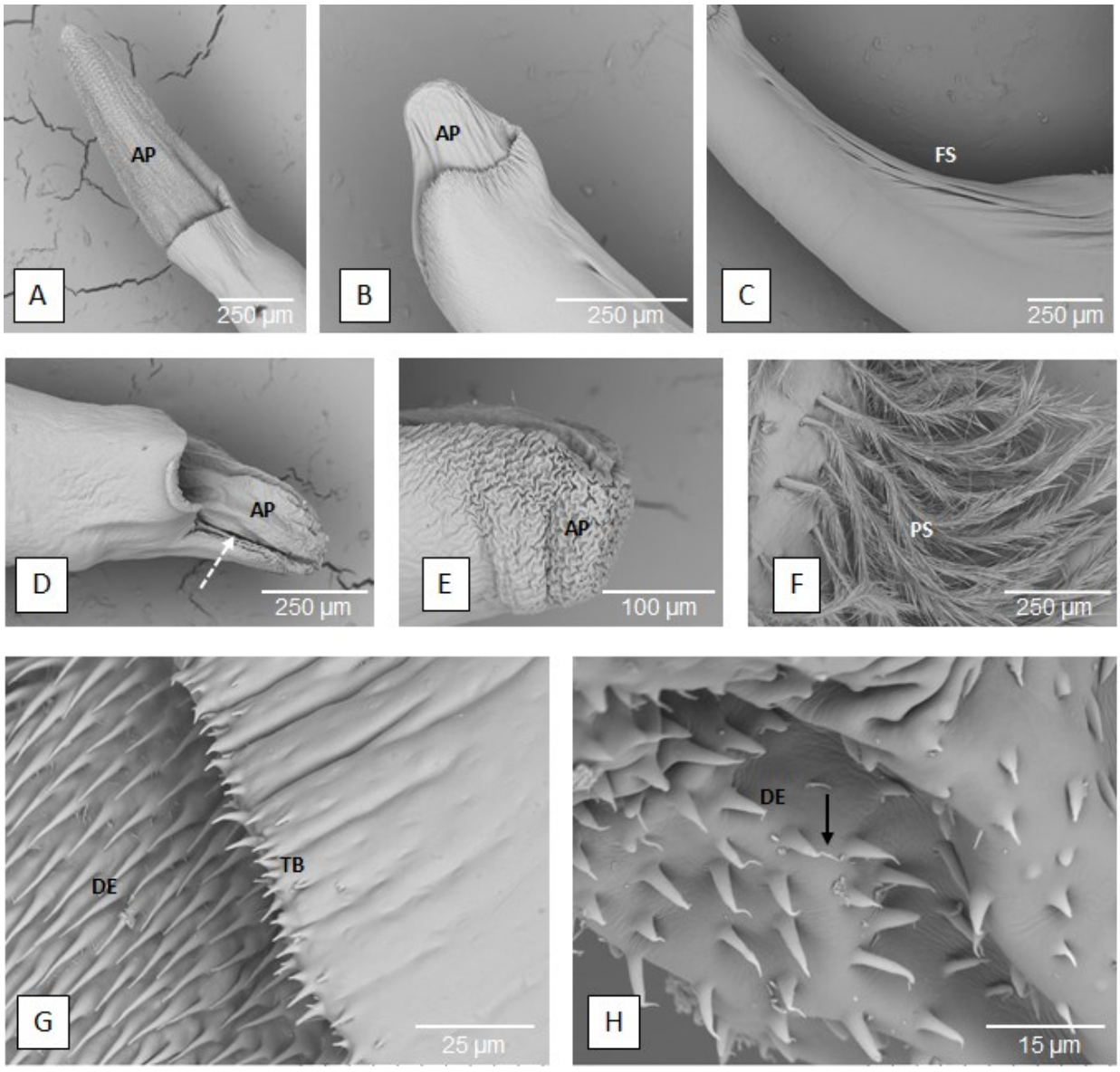

Figure 4 - Scanning electromicrographies of the second gonopod of Thoracotremata crabs. A) Terminal region evincing the appendix masculina (AP) in *C. guanhumi*; B) Appendix masculina in *G. cruentata*; C) Abdominal side of the second gonopod in *G. cruentata* with longitudinally folded surface (FS); D) Appendix masculina in *U. cordatus* where longitudinal folding can be observed (dotted arrow); E) External side with appendix masculina folding in *U. cordatus*; F) Pappose setae (PS) present in the proximal region of the second gonopod in *C. guanhumi.* G) Details of the appendix masculina' internal surface and the terminal border (TB) of the second gonopod in *C. guanhumi* evidencing the presence of denticules (DE); H) Internal surface of the appendix masculina in *U. maracoani* with denticules with small curved filaments (arrow).

FIGURE 5

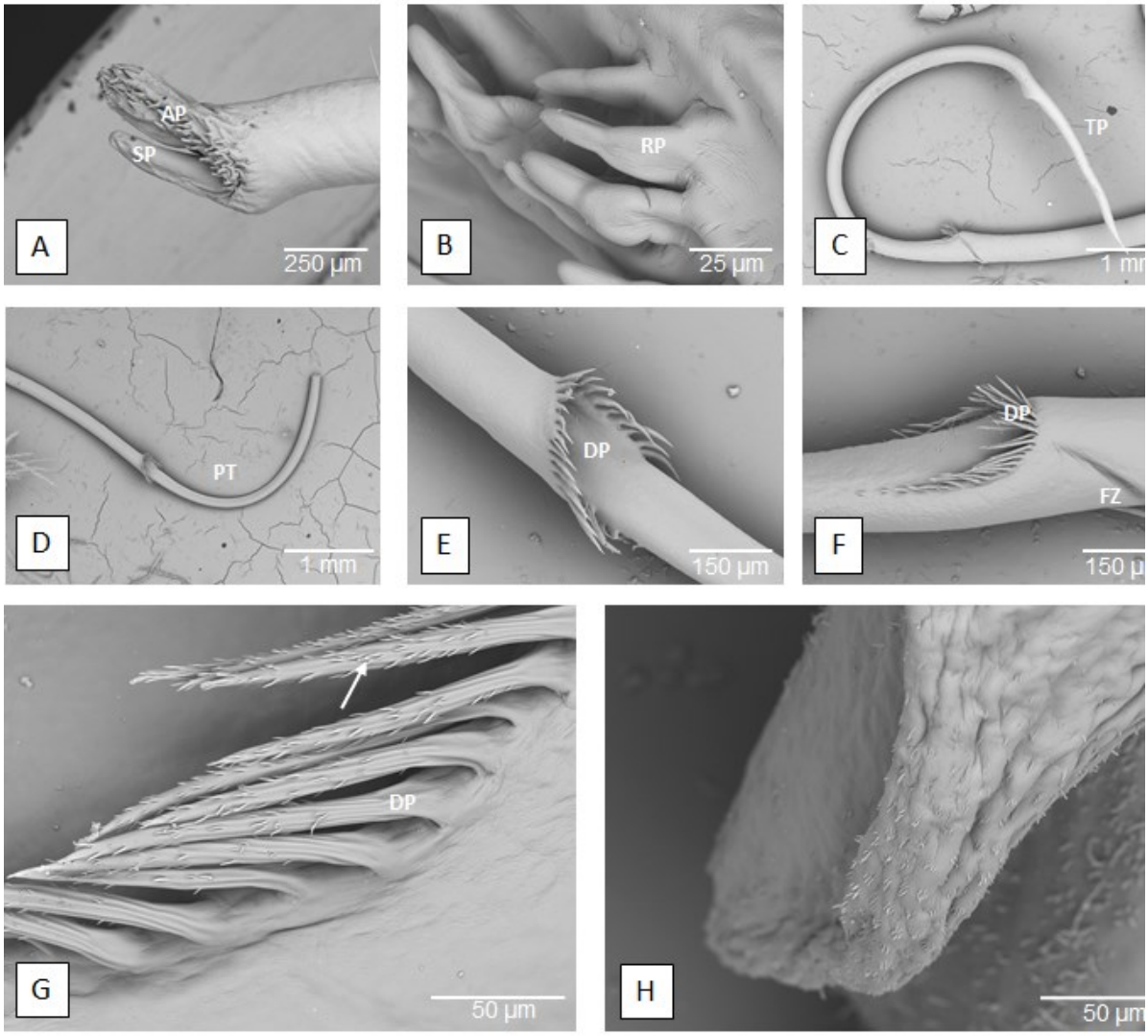

Figure 5 – Scanning electromicrographies of the second gonopod of Heterotremata crabs. A) Terminal region with a secondary projection (SP) besides the appendix masculina in *C. bocourti*; B) Internal surface of the appendix masculina in *C. bocourti* with robust projections (RP); C) Sharpened terminal portion (TP) in *M. nodifrons*; D) Sharpened terminal portion in *E. gonagra*; E) Denticulated projections (DP) present in the subterminal region in *E. gonagra*; F) Denticulated projections in the subterminal region in *M. nodifrons*, where it can be observed in the opposite side a gonopod's flexion zone (FZ); G) Detail of the projections with denticules (arrow) present in *M. nodifrons*; H) Subterminal region in *M. nodifrons* with a protuberance, in which its surface is covered by groupings of denticules.

FIGURE 6

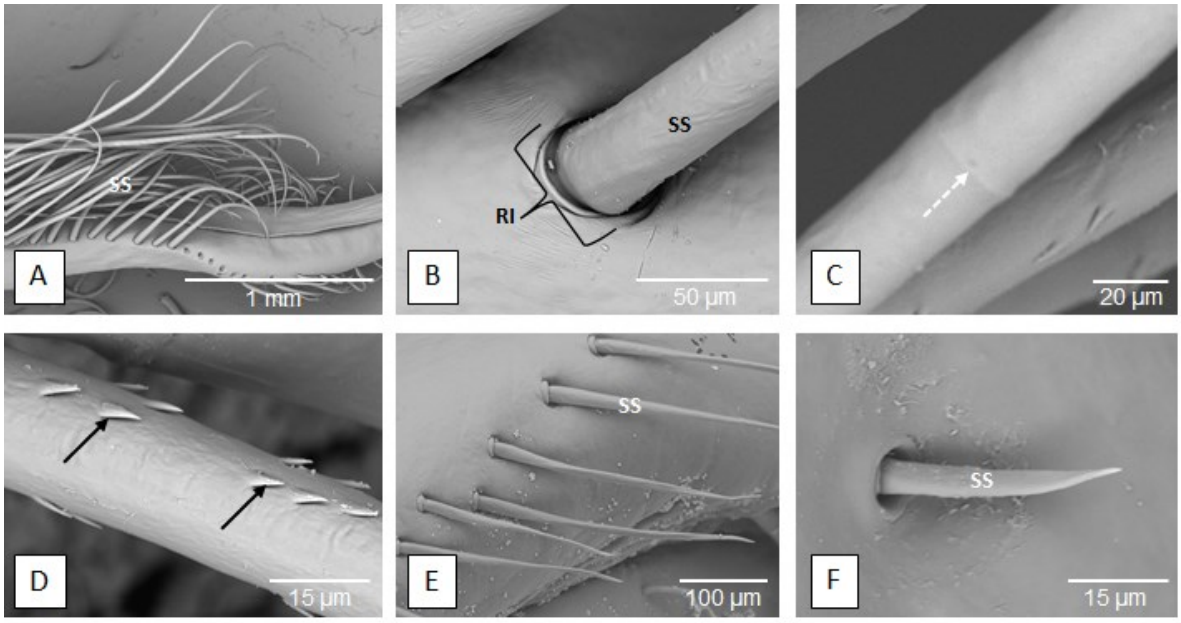

Figure 6 – Scanning electromicrographies evincing different shapes of setae of the simple type. A) Simple setae (SS) elongated; B) Ringed insertion (RI) in the gonopod's cuticle where the simple seta (SS) is inserted; C) An annulus (dotted arrow) generally in the medium portion of the simple setae; D) Denticules (arrows) present in 2/3 terminals of the simple setae in *E. gonagra*; E) Simple setae elongated and flattened transversally; F) Short simple setae. Species: A, B, C and D - *E. gonagra*; E - *U. maraconai*; F - *M. nodifrons*.

FIGURE 7

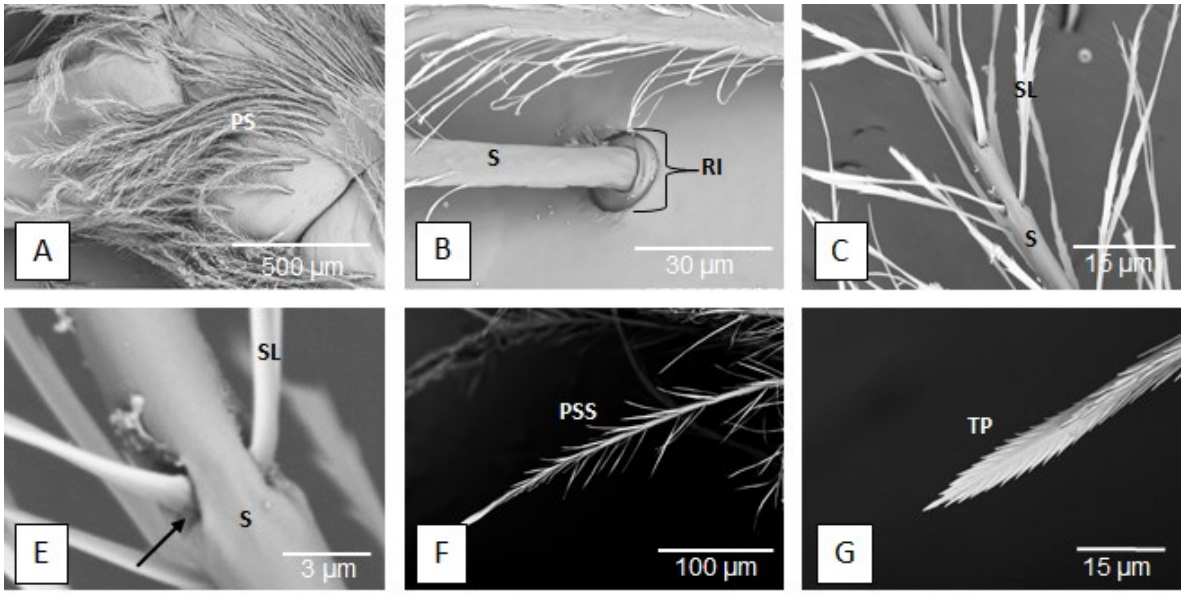

Figure 7 – Scanning electromicrographies of pappose and papposerrate typed setae observed in Eubrachyura gonopods. A) Pappose setae (PS); B) Ringed insertion (RI) present in the connection point between the stem's (S) cuticle of the gonopod and the pappose setae; C) Setules (SL) present in the pappose setae; E) Setules insertion in the stem of pappose setae; F) Papposerrate setae (PSS) with setules in the proximal and medium portion; G) Detail of the terminal portion (TP) of the paopposerrate setae. Note the serrated borders. Species: A, B, C and D - *M. nodifrons*; F and G - *C. bocourti*

FIGURE 8

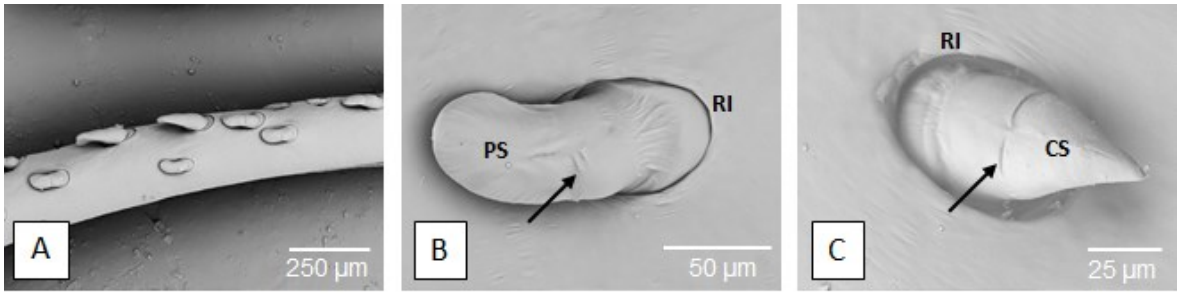

Figure 8 – Scanning electromicrographies of the first gonopod in *C. bocourti*. A) First gonopod evincing the distribution of paddleform setae; B) Paddleform seta (PS) where a central ringing (arrow) and a ringed insertion (RI) can be observed; C) Conate setae (CS) with central ringing.

4. DISCUSSION

4.1. First and second gonopods

During Eubrachyura crabs mating the transference of spermatozoa to females is made through the interaction of the penis papilla, first and second gonopods. This reproductive combination does not exist elsewhere in the Decapoda (Ng *et al*. 2008). The first gonopod of crabs analyzed here shows cuticle longitudinal invagination, forming a duct which is denominated ejaculatory canal in Brachyura (HARTNOLL, 1975; BENINGER et al., 1991). Its function is to transport the ejaculate, which is deposited in the basal portion (by penis papilla) of the first gonopod until its terminal portion, where it will be transferred to the female genital ducts. The act of dislocating the ejaculate throughout the ejaculatory canal is performed by the second gonopod. In Thoracotremata, during mating, this second pair is inserted in the basal pore of the first one, acting like a piston, bombing the spermatophoric mass from the basal pore of the first one until the distal portion opening of the gonopod (SPALDING, 1942; RYAN, 1967; BAUER, 1986; BENNINGER et al., 1991). The data obtained in the present research reinforce that in Eubrachyura the second gonopod performs this function. According to Elner et al. (1985) this bombing is a result of the abdomen moving during mating. In species in which the second gonopod is larger than the first, like *E. gonagra* and *M. nodifrons*, the insertion in the second gonopod must occur through the ejaculatory canal lateral opening, as suggest by Brandis et al., (1999) and Tsuchida and Fujikura (2000).

According to Hartnoll (1975) the size difference in the second gonopod reflects an evolutionary tendency in Brachyura copulatory system, i. e., reduction of the second gonopod. When analyzing the data from the present research and the results of other studies, it is possible to confirm this tendency. Representatives of Thoracotremata, considered a more derived group, present the second gonopod shorter than the first (LAUTENSCHLAGER et al., 2010; BECKER et al, 2012). In Heterotremata, a variation was verified, observing individuals with second gonopods larger or smaller than the first gonopod (BENINGER et al., 1991; MOYANO et al., 2011; SPALDING, 1942; TSUCHIDA; FUJUKURA, 2000; BRANDIS et al., 1999).

In species in which the second gonopod is short, it is suggested that the main function of transferring spermatozoa to the female's genital ducts falls upon the first gonopod, and the second only performs a auxiliary function, bombing. However, in species in which the second gonopod is bigger than the first, like in Heterotremata *E. gonagra* and *M. nodifrons*, it is possible that it participates more in the spermatozoa transference to the female genital duct,

allowing its insertion in the female's vagina. It is suggested that this process occurs in species of the *Potamon* sp, in which the first gonopod would have the function to stabilize the second long one, and this would be introduced in the female's vagina, performing the spermatozoa transference (BRANDIS et al., 1999). According to Tsuchida and Fujikura (2000), in *Austinograea williamsi*, the first gonopod would act like a sensor, guiding the second one to be inserted in the female's seminal receptacle. In *M. nodifrons* the existence of a flexible zone in the second gonopod's distal portion was observed. This flexible zone would function to allow the correct insertion in the female's vagina (BRANDIS et. al., 1999), what reinforces the hypothesis that in *M. nodifrons* the second gonopod would be inserted during mating.

The wide form of the first gonopod's terminal portion in Thoracotremata, the presence of many setae in this region, which could raise difficulties to penetration, as well as the short extension of the terminal projection, suggested that in *U. cordatus*, *G. cruentata, U. maracoani* and *C. guanhumi* the gonopod's final portion would not be inserted in the female's vagina. Possibly, the apical projection present in these species would promote the opening and fitting in the female's gonopore. Through the opening in the ejaculatory canal present in this projection, spermatozoa would be transferred to the vagina, and the vaginal musculature would act to dislocate them to the seminal receptacle. This hypothesis of the terminal projection function can be reinforced by the observed rotation in the gonopod's final portion, which makes this projection be oriented in direction to the female's gonopore. In *C. guanhumi*, the elongated apical projection is probably the one that is inserted in the vagina, transferring spermatozoa. This projection possibly acts to remove spermatozoa from males that previously mated with the female, ensuring the fertilization of oocytes by its spermatozoa, preventing the fertilization by other male, and characterizing a spermatic competition. In *E. gonagra* and *C. bocourti* the first gonopod's distal portion is filamentous and has no setae, therefore, being possible the insertion of this region in the female's vagina.

A similar structure to the apical projection found in the first gonopods of analyzed Thoracotremata was also reported by Turkay (1983) for Gecarcinidae crabs and by Lautenschlager et al. (2010) for species in the *Uca* genus. According to these authors, the form of this structure can act as a key-locker mechanism, allowing that the male mate only with same species females, due to this projection form and size. This mechanism occurrence was evident in species analyzed in the present research, in which this structure was curved and similar in form to the female's gonopores opening, reinforcing the hypothesis that this projection acts to promote the gonopore opening and insertion of spermatozoa in the female's

vagina. According to Lautenschlager et al. (2010) this mechanism is characteristic in Thoracotremata. However, it does not apply to all Eubrachyura, as it was observed in the present research, in which terminal projections were not observed in Heterotremata. Still according to these authors, specific fitting facilitates the transference of the ejaculate to the female's vagina, minimizing loss and need of liquid when mating in terrestrial environment. In fact, apical projections occur only in semi-terrestrial species *U. cordatus, G. cruentata, U. maracoani* and terrestrial *C. guanhumi*.

In Thoracotremata and in species of *C. bocourti*, the second gonopod's terminal region was round-shaped, and that functions as to seal the spermatic canal during sperm bombing in the first gonopod, avoid the outpouring of seminal liquid during mating (BENINGER et al. 1991; MOYANO et al. 2011). The apical projection present in one of these gonopod's side border consists in a reduced and modified "appendix masculina", as suggested by Beninger et al. (1991) for *C. opilio*. In *C. bocourti*, on the opposite side of the "appendix masculine", a smaller projection is observed. Bauer (1976) and Beninger (1991) reported the presence of a second projection in the first gonopod's distal portion, as a modified and vestigial structure, the appendix interna. McLaughlin (1980) classified the appendix masculine as being present in the second masculine pleopode of Caridae and some Eucarida crustaceous to be used in spermatozoa transference. The appendix interna is also considered an auxiliary structure in the gamete transference (TAVARES; MARTIN, 2010).

4.2. Setae - types and functions

Few studies have described these types of setae observed in the gonopods of Brachyura crabs, and the same was done to *C. opilio* (BENINGER et al. 1991) and *L. spinosa* (MOYANO et al., 2011). In total, five types of setae are distributed in the gonopods of the species analyzed by this research. The most common ones are simple and pappose, present in all species. The type papposerrate was observed only in *C. guanhumi,* and the oar-shaped and conated only in *C. bocourti*. Moyano et al. (2011) described six types of setae present in the gonopods of *L. spinosa*, while Beninger et al. (1991) described eight types in *C. opilio*. This difference in number of setae types between these two researches and the present one is due to different criteria adopted to classify these structures. In this research, the classification of setae followed up the characteristics described by Garm (2004) and Thomas (1970), such as presence of ring-shaped insertion and anullus. In this manner, projections which did not showed these characteristics, like denticules and setules, were not considered as setae, but only cuticle projections.

The presence of simple setae, especially in the first gonopods' distal portion of analyzed Thoracotremata species, suggests that these act during mating to stabilize and help in fitting the gonopod into the female gonopore, as suggested by Beninger et al. (1991) for *C. opilio*. Still according to these authors, the insertion of these simple setae (referred as type I and II) in a ringed dimple would allow movements in different directions, suggesting a mechanoreceptor function. Moyano et al. (2011) suggested that these simple setae (referred by the author as type II) would act to protect the gonopods against damaging events. This function was evident, mainly in Thoracotremata analyzed in this research, in which simple setae were found concentrated in the first gonopod's distal region, covering up the terminal projection partially and promoting protection to this structure essential in spermatozoa transference. In *C. bocourti*, the structure responsible to stabilize the first gonopod during mating must be the oar-shaped setae, through water moving in the abdominal region. The denticules, presents on the surface of the first gonopods of *M. nodifrons* and in simple setae of *E. gonagra*, must help in adherence of the gonopods during mating.

Beninger et al. (1991) also associated the presence of simple setae to the spermatic competition in *C. opilio*. In this species, simple setae are turned in direction of the first gonopod's proximal region, helping in the removal of the ejaculate from previous males that mated with the female. In the analyzed species of the present research, these setae did not perform this function, since they were turned in direction to the first gonopod's distal region, and were also not inserted in the vagina during mating, as described previously. Spermatic competition is probably performed only by apical projection in *C. guanhumi*.

Phillips and Macmillan (1987) described as a function of pappose seta, referred by the author as *pinnate,* vibrations monitoring, as observed in the antennae of the lobster species *Panulirus cygnus*. In Thoracotremata, some of these setae are observed in the first gonopod, where they probably have a function analogous to the lobster's antennae, like it was also proposed by Beninger et al. (1991) for *C. opilio*. The papposerrate setae present in *C. guanhumi*, possibly also perform this function. The pappose setae are present in the proximal region, mainly in the aperture of the spermatic canal in the first gonopod and in the second gonopod's proximal region. The presence of a great number of setules in the pappose setae from this region forms a barrier that retains detritus, preventing the entry of materials that decrease sperm flow in the ejaculatory canal. The setules, depending on its size and density, can act as a filter or as a brush (POHLE; TELFORD, 1981). This act of forming a barrier was

described also by Garm (2004) to the mouthpiece of crustaceous, where the pappose setae avoid that food particles escape from the buccal region.

In any of the analyzed species was evidenced the presence of terminal or subterminal pores in the setae. According to Pohle and Telford (1981) the presence of a terminal pore through where comes the chemical stimuli in the setae is an indication that this performs chemoreception. However, the histological results showed gonopods setae lumen (unpublished data). In the apical portion of some setae, the lumen is separated from the environment by a thin cuticle. This suggests the occurrence of chemoreception function.

In the second gonopods of Thoracotremata and Heterotremata *C. bocoute*, projections located in the distal region border or in the "appendix masculina" were observed, varying in size, shape and quantity between species, being very numerous and shaped as denticules in *C. guanhumi, G. cruentata, U. maracoani* and more robust in *C. bocourti*. Two hypothesis concerning functions can be attributed to these structures: 1) break through the thin layer that forms the spermatophores, during its bombing, providing the transference of some free spermatozoa to the seminal receptacle; 2) act as a mechanism which prevents spermatozoa loss during the bombing of seminal liquid, through the retention of spermatophores in the spaces between these projections, avoiding the outpouring of these through the basal pore. In Heterotremata this function is probably carried out by elongated projections covered with denticules that encircle the gonopod of *E. gonagra* partially and the gonopod of *M. nodifrons* in a crescent shape.

According to Pohle and Telford (1981) the number of functions performed by setae can vary, and some can perform more than one function. Some were suggested in the present research. However, for a more complete analysis and understanding of these functions it would be necessary that microscopic data were allied to ultrastructural studies, mating observations, as well as physiologic and experimental analysis, therefore allowing understanding of the mechanism of performance of these projections during mating and the spermatozoa transference in Eubrachyura.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (Process n° 2009/52821-2). The authors would like to thank technicians Antônio Teruyoshi Yabuki, Monika Iamonte and Pablo Barros Brito for the support in material processing and analysis and to Jussiara Linhares for the article revision.

5. REFERENCES

ADIYODI, R. G.; SUBRAMONIAM. T. Arthropoda Crustacea. In: ADIYODI, K. G.; ADIYODI, R. G**. Reproductive Biology of Invertebrates**. John Wiley & Sons Ltd., v. 1, 1983, p. 443-495.

BAUER, R. T. Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. **Journal of Crustacean Biology**, v. 6, p. 313–325, 1986.

BECKER, C.; TURKAY, M.; BRANDIS, D. The male copulatory system of European Pea Crabs (Crustacea, Brachyura, Pinnotheridae). **Journal of Morphology**, v. x, p. x-x, 2012

BENINGER, P. G.; ELNER R. W.; POUSSART Y. Gonopods of the majid crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius). **Journal of Crustacean Biology.** v. 11, p. 217–228, 1991.

BRANDIS, D.; STORCH, V.; TURKAY, M. Morphology and function of the copulatory system in freshwater crabs of the genus *Potamon*. **Journal of Morphology**, v. 239, p. 157-166, 1999.

ELNER, R. W.; GASS, C. A.; CAMPBELL, A. Mating behaviour of the jonah crab, *Cancer borealis* Stimpson (Decapoda, Brachyura). **Crustaceana**, v.14, p. 34–39, 1985.

FARMER, A. S. The functional morphology of the mouth-parts and pereiopods of *Nephrops norvergicus* (I,.) (Decapoda: Ncphropidae). **Journal of Natural History**., v. 8, p. 121-142, 1974.

GARM, A. Revising the definition of the crustacean seta and setal classification systems based on examinations of the mouthpart setae of seven species of decapods. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 142, p. 233–252, 2004.

GUINOT, D. Propositions pour une nouvelle classification des Crustacés Décapodes Brachyoures. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences, Série D. Sciences Naturelles**, v. 285, p. 1049–1052, 1977.

GUINOT D. Principes d'une classification évolutive des Crustacés Décapodes Brachyoures. **Bulletin biologique de la France et de la Belgique**, v. 112, p. 211-292, 1978**.**

HARTNOLL, R. G. Mating in the Brachyura. **Crustaceana.** n. l6, p. 161- 181, 1969.

HARTNOLL. R. G. Copulatory structure and function in the Dromiacea, and their bearing on the evolution of Brachyura. **Pubblicazione de la Stazione Zoologica di Napoli**, v. 39, p. 657–676, 1975.

LAUTENSCHLAGER A, BRANDIS D, STORCH V. Morphology and function of the reproductive system of representatives of the genus *Uca*. **Journal of Morphology**. v. 271, p. 1281–1299, 2010.

LEITE, M. M. L. 2005. **Relações morfométricas para a compreensão de aspectos reprodutivos do caranguejo – Uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), no estuário do rio**

Coreaú-Ceará. Fortaleza-CE. Dissertação de Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais. Universidade Federal do Ceará.

LIRA, J. P. R. de. **História de vida do caranguejo *Goniopsis cruentata* (Latreille, 1803) em um manguezal do nordeste brasileiro.** 2012. Dissertação (mestrado em Programa de Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2012.

KROL, R. M.; HAWKINS, W. E.; OVERSTREET, R. M. Reproductive Componentes. In: HARRISON, F. W., HUMES, A. G. **Microscopic Anatomy of invertebrates**, v, 10: Decapod Crsutacea. Wiley-Liss, Inc. 1992, p. 259-343.

MARTIN, J. W.; ABELE, L. Notes on male pleopod morphology in the Brachyuran crab Family Panopeidae Ortmann, 1893, Sensu Guinot (1978) (Decapoda). **Crustaceana**, v. 50, n. 2, p 182-198, 1986.

MCLAUGHLIN, P. A. **Comparative morphology of recent Crustacea**. San Francisco: W H. Freeman, 1980, 177p.

MOYANO, M. P. S.; GAVIO, M. A.; CUARTAS, E. I. Copulatory system of the spider crab *Libinia spinosa* (Crsutacea: Brachyura: Majoidea). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdon.** v. 91, n. 8, p. 1617-1625, 2011.

NG, P. K. L.; GUINOT, D.; DAVIE, P. J. F. Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. **The Raffles Bulletin of Zoology**. Supplement 17, p. 1-286, 2008.

PHILLIPS, B. F.; MACMILLAN, D. L. Antennal receptors in puerulus and postpuerulus stages of the rock lobster *Panulirus Cygnus* (Decapoda: Palinuridae) and their potential role in puerulus navigation. **Journal of Crustacean Biology,** v. 7, p. 122-135, 1987.

POHLE, G.; TELFORD, M. Morphology and classification of decapod crustacean larval setae: a scanning electron microscopy study of *Disodactylus crinitichelis* Moreira, 1901 (Brachyura: Pinnotheridae). **Bulletin of Marine Science**, v. 31, p. 736–752, 1981.

RYAN, E. P. Structure and function of the reprductive system of the crab *Portunus sanguinolentus* (Herbst) (Brachyura: Portunidae). II. The Female system. **Proc. Symp. Crustacea Mar. Biol. Asso, India**., p. 522-544, 1967.

SAINT LAURENT, M. de, Sur la classification et la phylogénie des Crustacés Décapodes brachyoures. II. Heterotremata et Thoracotremata Guinot, 1977. **Comptes rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, v. 290, p. 1317–1320, 1980.

SPALDING, J. F. The nature and formation of the spermatophore and spem plug in *Carcinus maenas*. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 83, p. 389-423, 1942.

STEPHENSEN, K. The Branchyura of the Iranian Gulf. Appendix: the male pleopoda of the Brachyura. In: **Danish scientic investigations in Iran**, Part IV. Ejnar Munksgaard, Copenhagen, 1946, p. 57-237.

TAVARES, C.; MARTIN, J. W. Suborder Dendrobranchiata Bate, 1888. In: SCHRAM FR, VON VAUPEL KLEIN JC, FOREST J, CHARMANTIER-DAURES M, editors. **Eucarida: Euphausiacea, Amphionidacea, and Decapoda (partim). Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology – The Crustacea.** Leiden: Brill Publishers, 2010, pp. 99–164.

THOMAS, W. J. The setae of *Austropotamobius pallipes* (Crustacea: Astacidae). **Journal of Zoology.** v. 160, p. 91-142, 1970.

TSUCHIDA, S. FUJIKURA, K. Heterochely, relative growth, and goopod morphology in the bythograeid, *Austinograea williamsi* (Decapoda, Brachyura). **Journal of crustacean biology,** v. 20, n. 2, p. 407-414, 2000.

TÜRKAY, M. O. 1983. **Morphologisch-taxonomische Monographie der Gecarcinidae. Ein Beitrag zur vergleichenden Morphologie der Brachyura (Crustacea: Decapoda)**. – Inaugural- Disertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften vorgelegt beim Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe Universität zu Frankfurt am Main. p. 1–111.

WATLING, L. A classification system for crustacean setae based on the homology concept. In: FELGENHAUER B, WATLING LL, THISTLE A, eds. **Crustacean Issues** 6. , A.A. Balkema, Rotterdam. 1989, p. 15-26.

CAPÍTULO 3

Capitulo 3

TÍTULO: HISTOLOGIA E HISTOQUÍMICA DOS GONÓPODOS DE CARANGUEJOS EUBRACHYURA (SAINT LAURENT, 1980).

RESUMO

A estrutura interna dos gonópodos foi até agora pouco descrita para Brachyura, principalmente para espécies comerciais, onde estes apêndices são considerados importantes parâmetros na determinação da maturidade sexual de caranguejos. O presente trabalho teve como objetivo analisar a morfohistologia dos gonópodos de caranguejos Eubrachyura, procurando relacionar a estrutura e a função dos diferentes componentes teciduais no processo de transferência dos espermatozoides para as fêmeas. Foram coletados machos representantes de diferentes famílias de caranguejos Heterotremata e de Thoracotremata. Os animais crioanestesiados, tiveram seus gonópodos retirados e analisados histológica e histoquimicamente. Em todas as espécies analisadas, observou-se que os apêndices copulatórios de caranguejos Eubrachyura são formados por dois pares de gonópodos, constituídos por dois segmentos: um basal e largo – protopodito; e um distal e alongado – o endopodito. Histologicamente, os gonópodos das espécies de caranguejos Eubrachyura aqui analisados apresentaram pouca variação. Os protopoditos apresentaram-se preenchidos por tecido conjuntivo frouxo e musculatura estriada, enquanto que os endopoditos apresentaram tecido conjuntivo frouxo, feixes nervosos e glândulas tegumentais na região proximal. Em cortes transversais, constatou-se que o primeiro gonópodo possui invaginação longitudinal da cutícula, formando o canal ejaculatório, por onde os espermatozoides são transportados do vaso deferente até a sua porção distal do gonópodo. As secreções produzidas pelas glândulas tegumentais são liberadas no interior do canal ejaculatório, onde desempenham a função de lubrificação, permitindo o deslocamento dos espermatozóides, além e de compor o sêmen. Constatou-se a presença de lúmen nas setas presentes nos gonópodos. Em algumas espécies, o lúmen está separado do ambiente por uma fina cutícula e associado a células sensoriais internas ao gonópodo, sugerindo a função quimiorreceptora. Desta maneira, os gonópodos podem atuar na percepção de estímulos relacionados ao processo reprodutivo.

Palavra-chave: Glândulas tegumentais, gonópodos, setas

1. INTRODUÇÃO

Nos Decapoda, os espermatozoides apresentam consideráveis modificações morfológicas e perda de organelas, sendo portanto atípicos pela ausência de flagelo e peça intermediária (ADIYODI; SUBRAMONIAM, 1983). Em Brachyura, os espermatozoides são geralmente transferidos para as fêmeas em pequenos capsulas conhecidas como espermatóforos. Esta estrutura consiste em um capa protetora formada no trato reprodutor masculino (KROL et al., 1992). A transferência para a fêmea é mediada pelo primeiro e segundo pleópodos, comumente denominados de gonópodos. Estes são modificados para atuar como um órgão copulador (BRANDIS et al., 1999).

Para auxiliar no processo de transferência dos espermatozoides, os gonópodos apresentam em sua superfície especializações cuticulares e grande parte destas consistem em projeções alongadas e articuladas na base, denominadas de setas (GARM, 2004). A estrutura externa dos gonópodos foi descrita para Brachyura para diversas espécies (SPALDING, 1942; MARTIN; ABELE, 1986; BENINGER et al., 1991; BRANDIS et al., 1999; TSUCHIDA; FUJIKURA, 2000; LAUTENSCHLAGER et al., 2010; MOYANO et al., 2011; BECKER et al., 2012).

O táxon Brachyura pode ser dividido em três grupos baseado na localização dos orifícios genitais de machos e fêmeas. Nos Podotremata os orifícios são coxais em ambos os sexos; nos Heterotremata, incluindo famílias cujo orifício genital masculino é coxal e o

feminino esternal; e os Thoracotremata, cujos orifícios genitais localizam-se no esterno em ambos os sexos (GUINOT, 1977; 1978). Saint Laurent (1980) inclui os Heterotremata e os Thoracotremata como grupos irmãos em um táxon denominado Eubrachyura.

Poucos trabalhos descreveram a estrutura interna desses apêndices em Eubrachyura, tendo sido descrita para as espécies de caranguejos Heterotremata *Carcinus maenas* (SPALDING, 1942), *Chionoecetes opilio* (BENINGER et al., 1991) e *Potamon sp.* (BRANDIS, 1999); e Thoracotremata *Uca ecuadoriensis, U. forcipata, U. tangeri* (LAUTENSCHLAGER et al., 2010), *Libinia spinosa* (MOYANO et al., 2011), *Nepinnotheres pinnotheres, Pinnotheres pisum* e *P. pectunculi* (BECKER et al., 2012). Estes autores relataram a presença de glândulas tegumentais internamente aos gonópodos. De acordo com Felgenhauer (1992) essas glândulas seriam características da cutícula de crustáceos decápodes, variando em número e em componentes estruturais entre as espécies.

Compreender a estrutura e função dessas glândulas nos gonópodos auxiliaria no entendimento dos processos de cópula e fertilização. Além do mais, em algumas espécies os gonópodos são considerados importantes parâmetros de estudo da maturidade de caranguejos, visto que passam por modificações morfológicas quando o macho atinge a maturidade sexual. Desta maneira, obter resultados sobre a morfologia dos gonópodos torna-se uma ferramenta importante para o estabelecimento de planos de manejo de espécies comerciais e ameaçadas (BENINGER et al., 1991; LEITE, 2005; LIRA, 2012).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo, analisar a histologia e histoquimica dos gonópodos de caranguejos Eubrachyura e demonstrar as funções dos diferentes componentes teciduais destes apêndices no processo de transferência dos espermatozoides para as fêmeas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletados representantes de diferentes famílias de caranguejos Eubrachyura: Heterotremata Eriphiidae (*Eriphia gonagra*), Menippidae (*Menippe nodifrons*) e Portunidae (*Callinectes bocourti*); e Thoracotremata Grapsidae (*Goniopsis cruentata*); Gecarcinidae (*Cardisoma guanhumi*); Ocypodidae (*Uca maracoani*), Ucididae (*Ucides cordatus*) durante o ano de 2010 e 2013 na praia do Pacheco, Ceará, Brasil (3°41'S; 38°37'O) e no estuário do Rio Jaguaribe, Ceará (4°30'S; 37°46'O). A autorização para captura e transporte do material foi concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da

Biodiversidade (ICMBio – processo n° 24180-3). Foram capturados cinco machos de cada espécie.

Os animais coletados foram transportados em recipientes plásticos contendo água para o laboratório de Embriologia e Histologia Animal da Universidade Federal do Ceará, onde foram anestesiados por resfriamento em congelador, por aproximadamente 15 minutos. Em seguida, foi mensurada a largura do cefalotórax para posterior dissecação e retirada dos gonópodos. Estes foram fragmentados e perfurados com uma seringa para facilitar a difusão dos fixadores utilizados na rotina histológica. Como fixadores foram utilizados Glutaraldeído 2,5% em tampão Cacodilato (0,1M), Paraformaldeído 4%, Formol Ca 10% e mistura aquosa de Bouin. Os fragmentos foram submetidos durante 72 horas ao descalcificador I.E.D. Unit (Ion Exchange Decal Unit – Biocare Medical) e em seguida desidratados em série etílica, embebidos e incluídos em resina Leica.

As secções foram obtidas em micrótomo, tendo 3µm ou 8 µm de espessura. Estas foram coradas com hematoxilina-eosina (adaptado de JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) (estruturas basófilas em roxo e acidófilas em rosa); azul de bromofenol (adaptado de PEARSE, 1960) (proteínas totais); PAS (adaptado de JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) (a glicoproteínas) e Baker (adaptado de BAKER, 1946) (lipídios). As secções depois de coradas foram analisadas e fotografadas. As imagens foram capturadas em fotomicroscópio acoplado a microcomputador.

3. RESULTADOS

Em todas as espécies de Eubrahyura analisadas, observou-se que os gonópodos são formados por dois segmentos, o protopodito – localizado na região basal; e o endopodito - mais distal e alongado (Fig. 1A, B, C e D). O primeiro gonópodo é alongado e geralmente maior do que o segundo (Fig. 1E), exceto nos Heterotremata *E. gonagra* e *M. nodifrons*, nos quais o segundo gonópodo é maior do que o primeiro. Em todas as espécies o endopodito do primeiro gonópodo apresenta uma invaginação da cutícula que se estende longitudinalmente, formando um ducto – o canal ejaculatório (Fig. 1G). Esta invaginação tem inicio em uma abertura basal e segue para a região terminal. Nos Thoracotremata, se observa uma projeção de coloração marrom na região apical do primeiro gonópodo, contínua com o canal ejaculatório (Fig. 1F, G).

Nos Thoracotremata as regiões distal e proximal dos primeiros gonópodos apresentam muitas especializações cuticulares, as setas (Fig. 1A). Nos Heterotremata

analisados, essas setas foram observadas em menor número e distribuídas ao longo do eixo do gonópodo (Fig. 1C).

O segundo gonópodo (assim como o primeiro) também é constituído de um protopodito e endopodito, este alongado e coniforme, sem a formação de um canal ejaculatório, um orifício proximal e distal (Fig. 1B e D). O endopodito do segundo gonópodo pode ter tamanho variado, dependendo da espécie, sendo curto nos Thoracotremata e no Portunideo *C. bocourti* (Fig. 1B e E). Já nas espécies *M. nodifrons* e *E. gonagra*, é longo, sendo pouco maior do que o primeiro gonópodo (Fig. 1C e D). Na região proximal dos segundos gonópodos observam-se várias setas (Fig. 1B). D). Nos Thoracotremata a face voltada para o abdômen do segundo par de gonópodo apresenta-se pregueada longitudinalmente.

Histologia

Os gonópodos são estruturas revestidas por um epitélio colunar ou pavimentoso recoberto externamente por cutícula (Fig. 2A). Em cortes transversais do endopodito do primeiro gonópodo de todas as espécies aqui analisadas, foi possível observar o canal ejaculatório, o qual pode ser resultante da invaginação apenas da cutícula, como observado em *U. cordatus* (Fig. 2B), ou pode se inserir mais internamente no gonópodo, como constatados nas demais espécies analisadas (Fig. 2A).

Apesar da variação na forma, tamanho e projeções cuticulares presentes nas diferentes espécies aqui analisadas, os componentes teciduais dos primeiros gonópodos apresentaram-se distribuídos de forma semelhante, ou seja, o protopodito é preenchido por tecido conjuntivo frouxo e musculatura estriada. No endopodito, não se observou a ocorrência de tecido muscular, estando preenchido principalmente por tecido conjuntivo frouxo (Fig. 2A e D). Imersos neste, observou-se a presença de vasos hemais revestidos por uma delgada camada acelular e com interior preenchido por hemolinfa com aspecto granular e eosinófilo. Três tipos celulares foram predominantes na matriz do tecido conjuntivo frouxo: 1) células de forma oval, com citoplasma pouco evidente e núcleo com cromatina condensada, - os fibroblastos (Fig. 2D); 2) células hemais com núcleo geralmente compactado e citoplasma preenchido por grânulos eosinófilos – os granulócitos (Fig. 2F); 3) células arredondadas de núcleo com cromatina bastante condensada, citoplasma delgado eosinófilo, sem grânulos - os hemócitos hialinos (Fig. 2E). Este último tipo celular também pode ser observado no interior dos vasos hemais.

Localizado na região proximal do endopodito do primeiro gonópodo de todas as espécies aqui analisadas, observou-se a presença de glândulas multicelulares, compostas por células colunares com grânulos basófilos no citoplasma e de núcleo basal. Estas células tem organização radial em torno de um ducto, este se direciona para o canal ejaculatório (Fig. 3A, B e D). Na porção central da glândula, observa-se uma célula com citoplasma fracamente basófilo e com núcleo mais volumoso quando comparado aos das células secretoras (Fig. 3A). Os ductos dessas glândulas liberam seu conteúdo no lumem do canal ejaculatório por meio de orifícios presentes na cutícula (Fig. 3C). Tais orifícios, não foram visualizados em outros locais além do canal ejaculatório. Em *U. maracoani* pode-se observar algumas células com formato de cálice, cuja secreção reagiu fortemente com a hematoxilina (Fig. 3E). O número de glândulas diferiu de acordo com a espécie considerada. Em *C. bocourti* observou-se uma maior quantidade de glândulas, preenchendo quase que completamente a porção proximal do endopodito. Nas demais espécies, essas glândulas estavam presentes em menor número e localizadas apenas próximas ao canal ejaculatório. Nas análises histoquímicas em todas as espécies, essas glândulas reagiram fracamente aos testes para detecção de polissacarídeos, moderadamente para proteínas totais e não reagiram aos testes para lipídeos (Fig. 3F e G).

Também foi possível visualizar a histologia das projeções cuticulares dos gonópodos. Nos primeiros gonópodos de Thoracotremata observou-se que a projeção apical tem coloração marrom e é uma projeção da cutícula, cujo interior constatou-se um lúmen que é continuo com o canal ejaculatório (Fig. 2C). Em todas as setas, distribuídas nos gonópodos, foi possível observar um lúmen percorrendo a seta desde seu ápice até o interior do gonópodo onde se comunica por meio de orificios cutículares (Fig. 4A). Apenas nas setas da região distal dos primeiros gonópodos de Throracotremata e daquelas ao longo do primeiro gonópodo de Eubrachyura, o lúmen pareceu estar separado do meio externo por uma fina camada de cutícula (Fig. 4B).

As setas da região basal, também apresentaram um lúmen, no entanto, por serem delgadas e longas, não foi possível observar nas secções histológicas a extensão desse lúmen e se ocorre comunicação com o ambiente (Fig. 4E). Observou-se apenas a presença de uma delgada passagem fazendo a comunicão do lúmen dessas setas com o interior do gonópodo. Todas as setas se inserem em uma pequena anelada da cutícula (Fig. 4C). Abaixo do local de inserção das setas, observou-se um conjunto de células fusiformes, cujo citoplasma se estende até a entrada dos poros por onde as setas se comunicam com o interior dos gonópodos (Fig.

4D e F). Observou-se também, fibras nervosas percorrendo o gonópodo longitudinalmente (Fig. 2G).

Nos Thoracotremata, o segundo gonópodo apresentou uma variação considerável na espessura da cutícula, sendo em algumas regiões apresentou-se bastante delgada. Em Heterotremata esta se apresentou uniforme. Em secções transversais não se observou a presença de ductos nos segundos gonópodos das espécies aqui analisadas. Este apêndice, em todas as espécies estava preenchido por tecido conjuntivo frouxo e musculatura estriada. Em espécies cujo segundo gonópodo é curto (*G. cruentata, U. cordatus, C. guanhumi, U. maracoani* e *C. bocourti*), a musculatura se distribuiu longitudinalmente no órgão. Já nos indivíduos cujo segundo gonópodo era alongado, esta musculatura estava presente apenas na região proximal (Fig. 2H). A glândula tegumental multicelular está ausente em todo o órgão. Quando comparado ao segundo gonópodo, poucos hemócitos foram observados.

FIGURAS

FIGURA 1

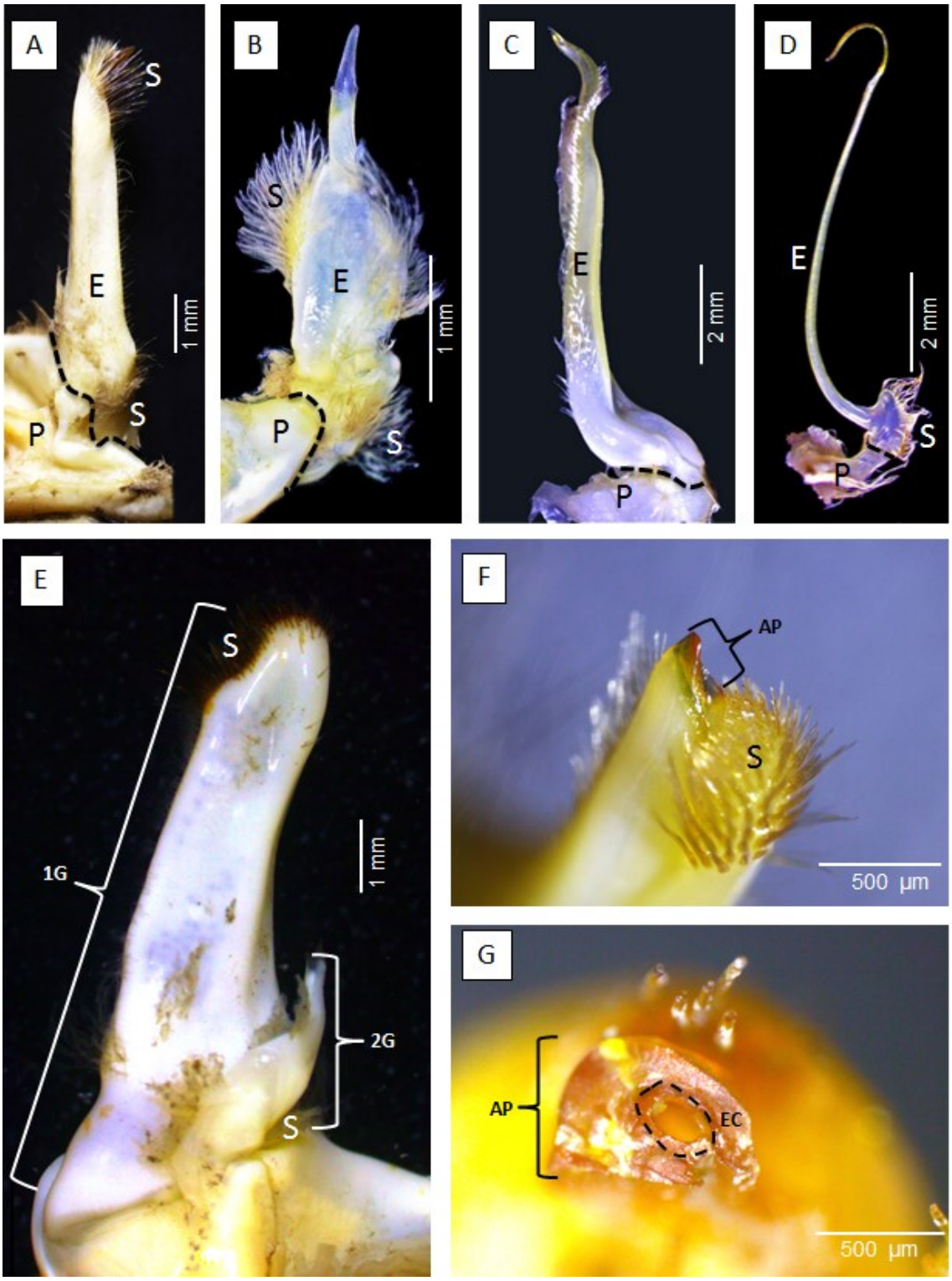
A
S
E
1 mm
P
S
B
S
E
1 mm
P
S
C
E
2 mm
P
D
E
2 mm
S
P
E
S
1G
1 mm
2G
S
F
AP
S
500 µm
G
AP
EC
500 µm

Figura 1 - Gonópodos em caranguejos Eubrachyura fotografadas no estereomicroscópio. A) Primeiro gonópodo do Thoracotremata *C. guanhumi.* B) Segundo gonópodo de *C. guanhumi*. C) Primeiro gonópodo do Heterotremata *E. gonagra*. D) Segundo gonópodo de *E. gonagra.* Linha pontilhada demonstra o ponto aproximado de divisão do endopodito (E) com o protopodito (P). E) Gonópodos do Thoracotremata *G. cruentata* evidenciando a diferença de tamanho entre o primeiro (1G) e o segundo (2G). F) Região terminal do primeiro gonópodo do caranguejo Thoracotremata *U. maracoani* evidenciando a projeção apical (AP). G) Corte transversal da projeção apical em *C. guanhumi* evidenciando o canal ejaculatório (EC). (S) Setas.

FIGURA 2

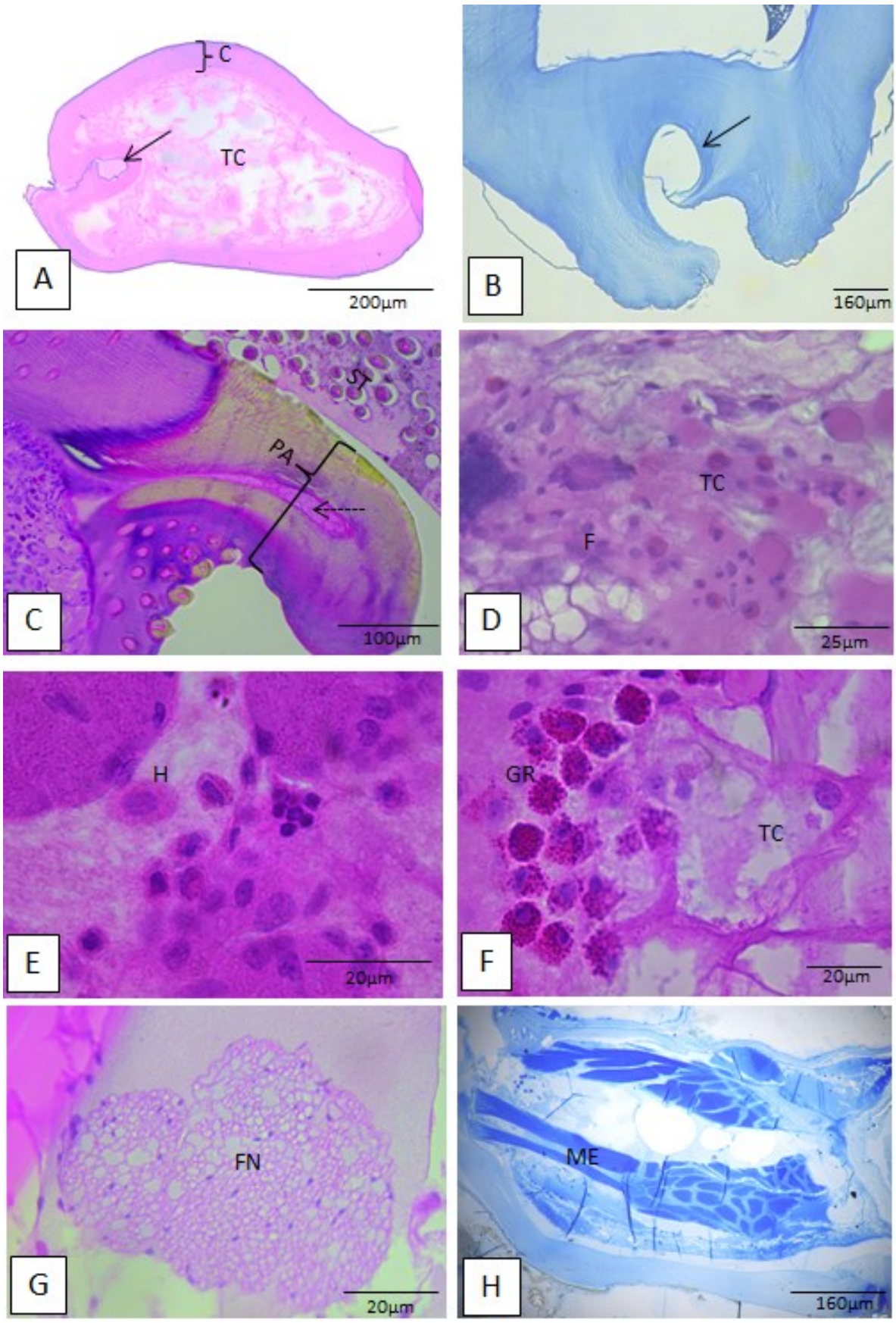
C
TC
A
200µm
B
160µm
ST
PA
C
100µm
TC
F
D
25µm
H
E
20µm
GR
TC
F
20µm
FN
G
20µm
ME
H
160µm

Figura 2 - Fotomicrografias dos gonópodos de caranguejos Thoracotremata. A) Secção transversal da porção mediana do endopodito do primeiro gonópodo. Tecido conjuntivo frouxo (TC). (C) cutícula, (seta) canal ejaculatório. Setas (ST). B) Canal ejaculatório em *U. cordatus* formado apenas pela invaginação da cutícula. C) Projeção apical (PA) evidenciando a presença do lúmen (seta pontilhada) do canal ejaculatório. Setas (ST) D) Tecido conjuntivo observado no primeiro e segundo gonópodos de caranguejos Eubrachyura. (F) Fibroblastos. E) Hemócitos hialinos (H). F) Granulócitos (GR). G) Feixe de fibras nervosas (FN) em secção transversal do primeiro gonópodo. H) Musculatura estriada (ME) localizada longitudinalmente no protopodito do segundo gonópodo. Coloração: Hematoxilina-eosina; Figuras B e H – Azul de bromofenol. Espécies: A, D e H – *U. maracoani;* B – *U. cordatus;* C, E, F e G – *G. cruentata;*

FIGURA 3

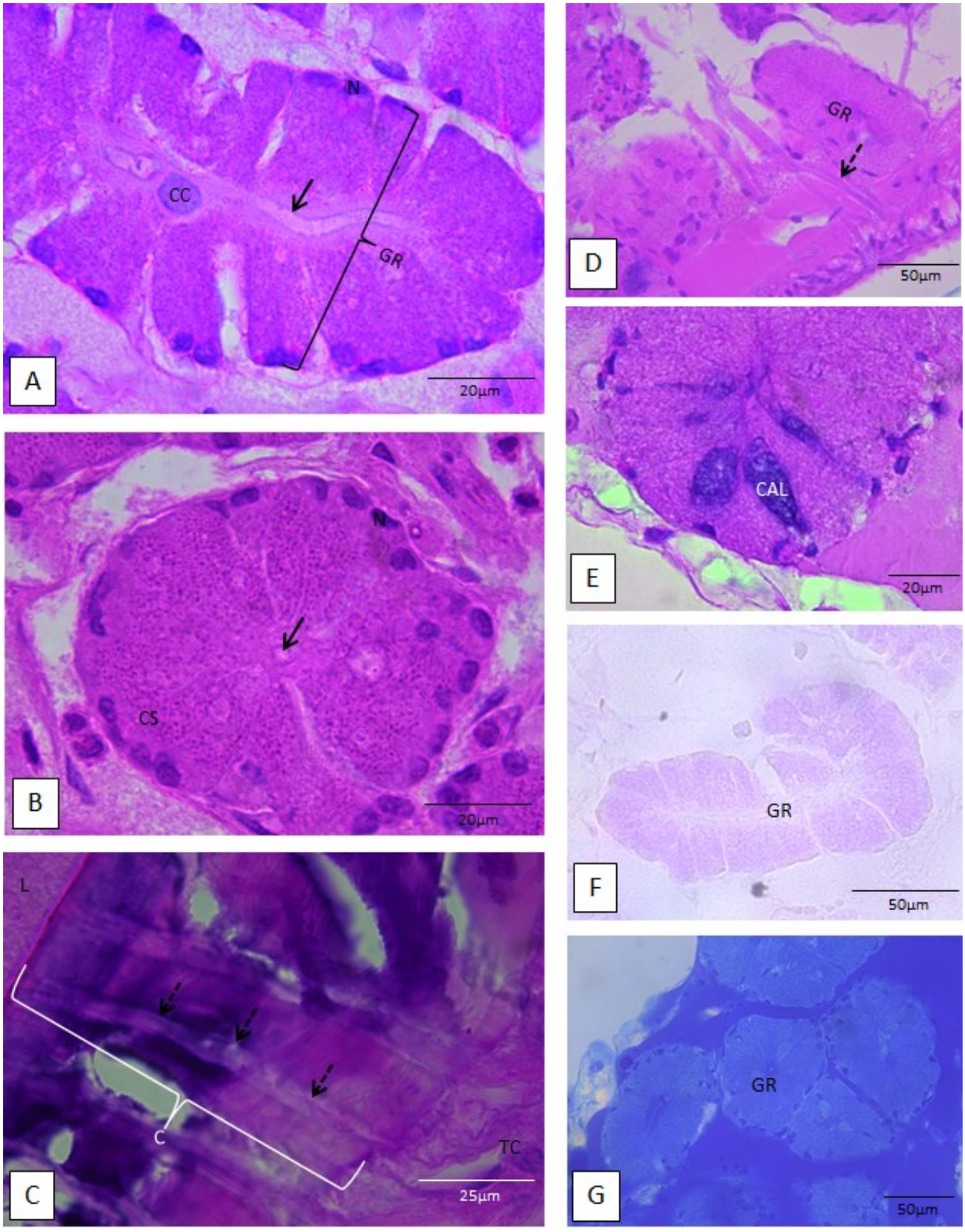
A
N
CC
GR
20µm
B
N
CS
20µm
C
L
C
TC
25µm
D
GR
50µm
E
CAL
20µm
F
GR
50µm
G
GR
50µm

Figura 3 - Fotomicrografias da região proximal do endopodito dos primeiros gonópodos de caranguejos Thoracotremata. A) Secção longitudinal da glândula tegumental em forma de roseta (GR) evidendiando um ducto (seta) formado pela célula central (CC). (N) núcleo basal da célula secretora. B) Secção transversal da glândula em roseta (GR) evidenciando as células secretoras (CS) em torno do ducto central (seta). C) Poros (setas) presentes na cutícula do canal ejaculatório por onde passa a secreção das glândulas em roseta. (C) cutícula, (TC) Tecido conjuntivo, (L) lúmen do canal ejaculatório. D) Ductos provenientes das glândulas em roseta (seta pontilhada). E) Células em forma de cálice (cal) presentes nas glândulas em roseta de *U. maracoani* .F) Glândula em roseta evidenciando a baixa concentração de polissacarídeos. G) Glândulas em Roseta evidenciando proteínas totais. Coloração: Hematoxilina-eosina. Figura F –PAS; G – Azul de bromofenol. Espécies: A, B, C, D e F – *G. cruentata;* E e G – *U. maracoani;*

FIGURA 4

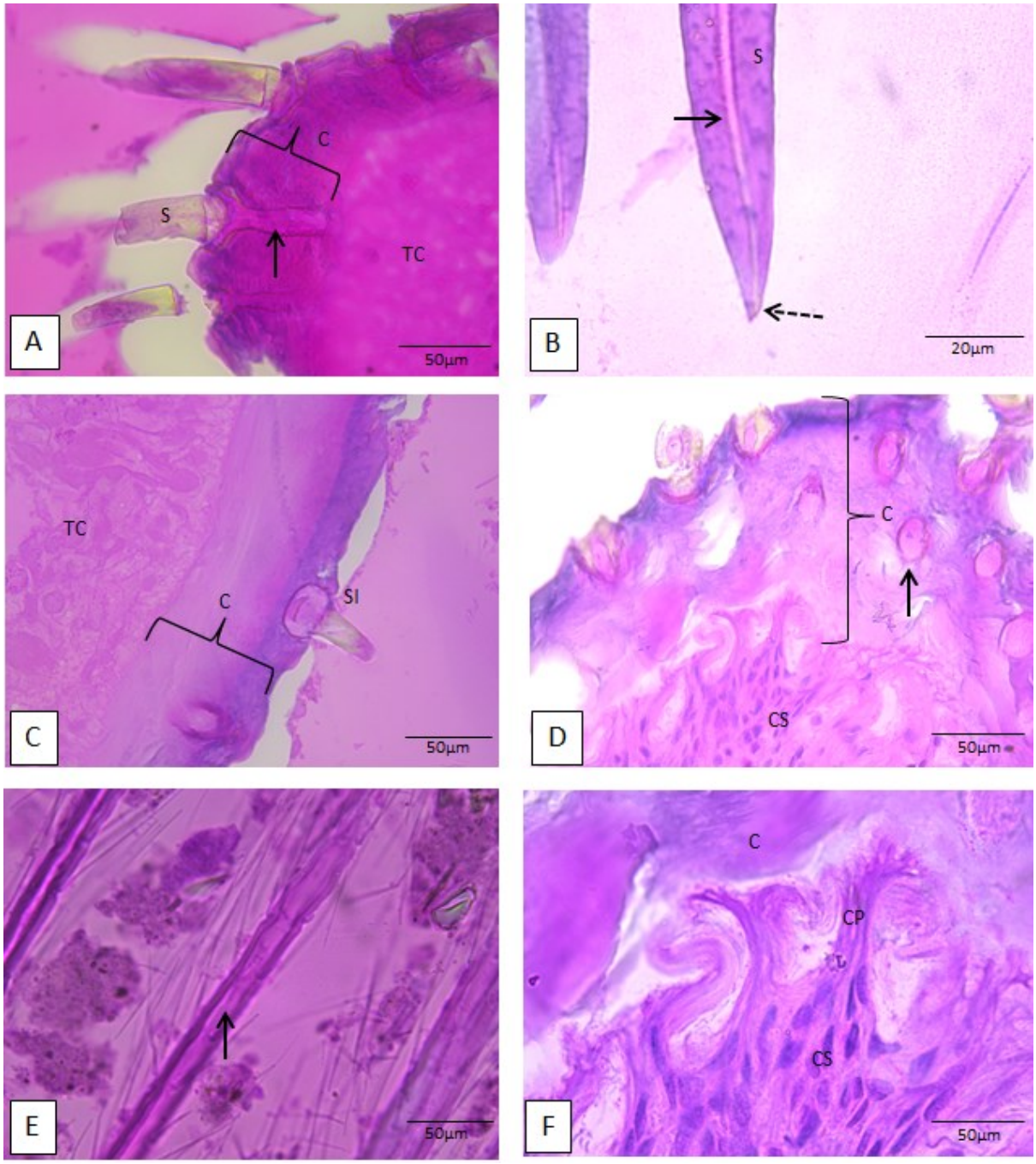

Figura 4 – Fotomicrografias das setas (S) e estruturas sensoriais presentes nos gonópodos de Thoracotremata. A) Região distal do primeiro gonópodo de *U. maracoani* evidenciando a passagem do lúmen das setas (seta) pela cutícula (C). B) Porção terminal de uma seta localizada na região distal do primeiro gonópodo, evidenciando o lúmen e a separação deste com o ambiente por uma fina camada de cutícula (seta pontilhada). C) Inserção das setas (SI) em depressão localizada na cutícula C). Tecido conjuntivo (TC). D) Região terminal do primeiro gonópodo evidenciando a presença de células sensoriais (CS) abaixo da região de inserção das setas na cutícula. Lúmen das setas atravessando a cutícula (seta). E) Corte transversal das setas presentes na região basal dos gonópodos evidenciando a presença de um lúmen (seta). (F) Detalhamento das células sensoriais evidenciando suas projeções em direção ao local de inserção das setas na cutícula. Coloração: Hematoxilina-eosina. Espécies: A e F - *U. maracoani;* B, D e F - *G. cruentata.* C - *U. cordatus.*

4. DISCUSSÃO

Durante a cópula de caranguejos Eubrachyura a transferência dos espermatozoides para as fêmeas é realizada por meio da interação do primeiro com o segundo gonópodo. O primeiro tem a função de transportar o ejaculado depositado (pela papila peniana) na porção proximal até a terminal de onde será transferido para os ductos genitais femininos. A função de deslocar o ejaculado ao longo do canal ejaculatório é desempenhada pelo segundo gonópodo. Em Thoracotremata, durante a cópula, este segundo par se insere no poro basal do primeiro, atuando como um pistão, bombeando a massa espermatofórica desde o poro basal do primeiro até a abertura presente na porção distal do gonópodo (SPALDING, 1942; RYAN, 1967; BAUER, 1986; BENNINGER et al., 1991).

Estes apêndices apresentam diversas projeções cuticulares distribuídas na sua superfície, cujas funções podem variar segundo o tipo e a localização no gonópodo.

Análise histológica

Histologicamente, os gonópodos das espécies de caranguejos Eubrachyura aqui analisados apresentaram pouca variação. O primeiro par apresentou invaginação longitudinal da cutícula, formando um ducto denominado, em Brachyura, de canal ejaculatório (HARTNOLL, 1975; BENINGER et al., 1991). Nas secções, não foi observada musculatura associada a esse canal ou estruturas que pudessem realizar o movimento do sêmen a ser ejaculado, tais como cílios e flagelos. A ausência dessas estruturas reforçou a necessidade da função de bombeamento do segundo gonópodo para o deslocamento do material espermático pelo canal ejaculatório.

Observou-se, no tecido conjuntivo, a presença de hemócitos de dois tipos diferentes: os hialinos e os granulócitos, caracterizados por Johnson (1980) como sendo os dois tipos principais. Martin e Hose (1992) definiram a função dos hemócitos como análoga a dos leucócitos dos vertebrados, ou seja, de reconhecimento e remoção de material estranho, bem como na coagulação da hemolinfa. Estas células estiveram presentes principalmente nos primeiros gonópodos, próximos aos poros que conectam o lúmen das setas ao interior do gonópodo.

Na região proximal do endopodito de todas as espécies analisadas, observou-se glândulas tegumentais multicelulares. Segundo Felgenhauer (1992), em Crustacea, as glândulas tegumentais originar-se-iam logo abaixo das células epidermais, podendo ser uni, tri ou multicelulares, sendo está última denominada de glândulas em forma de roseta,

terminologia esta também utilizada no presente trabalho. As características observadas nessas glândulas para as espécies aqui analisadas, onde se observou a presença de células secretoras em torno de um ducto central, assemelharam-se as descritas por outros autores para Brachyura (BENINGER et al., 1991; BENINGER; LAROCQUE, 1998; BRANDIS et al., 1999; MOYANO et al., 2011; BECKER et al., 2012). A ultraestrutura das glândulas tegumentais multicelulares foi descrita por Johnson e Talbot (1987) e Vitorri et al., (2012) que relataram a presença de uma célula localizada na região central da glândula. Esta célula formaria um ducto que transportaria a secreção até o seu local de liberação. Células localizadas na porção central da glândula em roseta também foram observadas no presente trabalho e possivelmente também teriam a função de formar um ducto para o transporte da secreção até o lúmen do canal ejaculatório.

Os resultados histoquímicos corroboraram com aqueles observados no conteúdo dos receptáculos seminais com secreções de natureza glicoproteica, também descrita no receptáculo seminal de *C. opilio* (BENINGER et al., 1993). Ainda de acordo com este autor, estas glicoproteínas são ricas fontes de energia além de serem higroscópicas, propriedade importante para abertura dos espermatóforos. Os lipídios não estiveram presentes nas secreções das glândulas tegumentais. Em invertebrados, geralmente os lipídios, além de serem um importante recurso energético, atuariam como estimulador da motilidade dos espermatozóides (GURAYA, 1987). Tal função não se aplicaria nas espécies aqui analisadas, visto que não foram observadas estruturas que indicassem a capacidade de motilidade dos espermatozóides. Dessa forma, essas células foram consideradas atípicas por não apresentarem flagelos, o que poderia justificar a pouca necessidade de lipídios no receptáculo seminal.

De acordo com Beninger e Larocque (1998), essa glândula ocorreria em Brachyura, sendo encontradas algumas semelhanças entre as espécies, tais como: 1) as glândulas em roseta estariam invariavelmente agrupadas no entorno ou próximas ao canal ejaculatório; 2) as glândulas comunicar-se-iam com o lúmen do canal ejaculatório via poros cuticulares, não sendo observados em outras regiões. Essas semelhanças confirmaram-se no presente trabalho. A localização das glândulas em roseta nos primeiros gonópodos de Brachyura está preferencialmente proximal no endopodito, como observado nas espécies aqui analisadas e também para *Portunus sebae, Ovalipes ocellatus, Cancer irroratus, Grapsus grapsus, Petrolisthes armatus* (BENINGER; LAROCQUE, 1998), *Pinnotheres pisum, P. pectunculi, Nepinnotheres pinnotheres* (BECKER et al., 2012) e *Chionoecetes opilio*

(BENINGER et al., 1991). Apenas nas espécies *Carcinus maenas* (BENINGER; LAROCQUE, 1998) e *Libinia spinosa* (MOYANO et al., 2011) foi observada essa glândula em localização distal no primeiro gonópodo.

Algumas funções reprodutivas foram atribuídas a essas glândulas em crustáceos, como por exemplo aderir os ovos aos pleópodos das fêmeas em lagostas *Homarus americanus* (JOHNSON; TALBOT, 1987). Já Mason (1970) sugeriu que essa secreção atuaria na dissolução do espermatóforo, liberando os espermatozoides para a fertilização. Spalding (1942) sugeriu que as secreções dessa glândula participariam da formação do espermatóforo, o que não foi observado em *U. cordatus, G. cruentata, U. maracoani* e *C. guanhumi,* visto que estas espécies já apresentavam espermatóforos formados nos vasos deferentes (LINHARES, 2010; GARCIA; SILVA, 2009; NASCIMENTO, 2011; SHINOZAKI-MENDES, 2012).

Em *U. maracoani,* foram observados dois tipos distintos de células secretoras: a) apresentando o citoplasma completamente preenchido por secreção de intensa basofilia – células em forma de cálice; b) apresentando diminutos grânulos basófilos de secreção. A presença de células secretoras morfologicamente distintas sugere que essa glândula secreta substâncias com funções diferentes. Beninger e Larocque (1998), ao analisar as glândulas em roseta de caranguejos Brachyura, sugeriram que estas não estão envolvidas exclusivamente com a reprodução. A forte basofilia observada nas células em forma de cálice seria também observada no sêmen presente nos receptáculos seminais das fêmeas de *U. maracoani,* sugerindo que uma das funções dessa glândula seja a de contribuir com a formação do sêmen. Além do mais, por estar localizada na região próxima a abertura basal do primeiro gonópodo, seria possível que as secreções provenientes dessa glândula, atuassem como um lubrificante, facilitando a inserção do segundo gonópodo no primeiro, bem como a execução do movimento de bombeamento dos espermatozoides pelo canal espermático (MOYANO et al., 2011). Spalding (1942), Bawab e El-sherief (1989) sugeriram que as secreções das glândulas em roseta formariam uma estrutura rígida (plug espermático) que vedaria o ducto genital feminino, impedindo a fertilização por machos em cópulas subsequentes. Por essa glândula estar localizada no órgão copulatório, pode-se considerar a hipótese de que essa também teria como função secretar substâncias que atuariam na receptividade dos machos pelas fêmeas ou até mesmo na secreção de ferormônios.

As secções histológicas mostraram a presença de musculatura bem desenvolvida no segmento basal, o protopodito. De acordo com Moyano et al., (2011) essa musculatura

poderia orientar o posicionamento dos gonópodos para o encaixe no gonóporo feminino, justificando a ocorrência de setas do tipo paposa em gonópodos de caranguejos Eubrachyura (Souza – dados não publicados). De acordo com Phillips e Macmillan (1987) a função da seta paposa (referidas pelos autor como pinada), faria o monitoramento das vibrações, como também observado ao longo da antena da lagosta *Panulirus cygnus*. Desta maneira, em Eubrachyura, essas setas possivelmente detectariam as vibrações do ambiente e a musculatura controlaria a movimentação dos gonópodos. Em espécies cujo segundo gonópodo é maior que o primeiro, como em *E. gonagra* e *M. nodifrons*, a inserção deste no segundo gonópodo deveria ocorrer via abertura lateral do canal ejaculatório, como sugerido por Brandis et al., (1999) e Tsuchida e Fujikura (2000). No entanto, não foi observado no entorno do canal ejaculatório destas espécies a presença de musculatura que pudesse realizar essa abertura.

A projeção apical presente nos gonópodos de Thoracotremata aqui analisados, também foi relatada por Lautenschlager et al. (2010) para espécies do gênero *Uca.* De acordo com esses autores, a forma dessa estrutura poderia sugerir a função de um mecanismo chave-fechadura, permitindo, devido a sua forma e tamanho, que o macho copulasse apenas com fêmeas de sua espécie. Além do mais, o encaixe específico, facilitaria a transferência do ejaculado para a vagina da fêmea, minimizando a perda de líquido para a cópula em ambiente terrestre (LAUTENSCHLAGER et al., 2010). De fato, as projeções apicais ocorreram apenas nas espécies semi-terrestes *U. cordatus, G. cruentata, U. maracoani* e terrestre *C. guanhumi*. A presença nessas projeções apicais de um lúmen contínuo com o canal ejaculatório, minimizando a perda de liquido espermático, reforçaria essa teoria.

Diferentes tipos de setas estão presentes no gonópodos de Eubrachyura. Dependendo do tipo e localização, estas setas teriam como função estabilizar o encaixe do gonópodo masculino ao gonóporo feminino, protegendo contra eventos danosos, quimio e mecanorrecepção, monitoramento de vibrações e filtração, impedindo a entrada de detritos no canal espermático (Souza – dados não publicados). Todas as setas presentes nas secções histológicas, apresentaram-se inseridas em uma depressão anelada na cutícula do gonópodo. Segundo Beninger et al. (1991)em estudo com *C. opilio* a inserção destas setas simples (referidas como tipo I e II) em uma depressão anelada, permitiria a estes, movimentos em diferentes direções, sugerindo uma função mecanorreceptora, atuando no posicionamento dos gonópodos para transferência dos espermatozoides durante a cópula.

As setas presentes nas regiões basal e distal do primeiro gonópodo apresentariam um lúmen em seu interior. Nas que ocorreram na região apical, o lúmen se aproximou bastante do exterior em seu ápice, parecendo estar separado deste por fina cutícula. De acordo com Anger (2001), a comunicação entre o ambiente e o lúmen ocorreria por meio de poros ou por meio de fina cutícula. Entretanto, nas analises de microscopia eletrônica de varredura realizada por Souza (dados não publicados), não se observou poro no ápice das setas de caranguejos Eubrachyura, corroborado pelos resultados aqui obtidos. Abaixo da região de inserção das setas na cutícula, internamente nos gonópodos, constatou-se a presença de um conjunto de células, cujas projeções se direcionaram para o poro cuticular por onde passaria o lúmen. Altner et al., (1983) descreveram as setas sensoriais presentes nas quelas do lagostim *Austropotamobius torrentium,* sendo cada uma inervada por oito células sensoriais bipolares, onde segmentos dos dendritos se estenderiam até o ápice da seta. Destas células, duas seriam mecanorreceptoras e as demais quimiorreceptoras. Desta maneira, as características apresentadas pelas setas apicais dos primeiros gonópodos de Thoracotremata, como a presença de lúmen se comunicando com o ambiente por meio de fina cutícula e de células sensoriais abaixo da cutícula dos gonópodos, sugerem que estas também teriam a função quimiorreceptora. Isso explicaria a presença de grande quantidade de hemócitos nesse órgão. Estas células provavelmente atuariam eliminando materiais ou substâncias estranhas captadas pelas setas. Sabe-se que em algumas espécies, como *Portunus sanguinolentus* (RYAN, 1966), *Pachygrapsus crassipes* (KITTREDGE et al., 1971) e *Carcinus maenas* (SEIFERT, 1982) as fêmeas emitem ferormônios indutores da procura por parceiro para cópula, a corte e o comportamento pré-copulatório. Desta maneira, a função de quimiorrecepção dos primeiros gonópodos poderia estar relacionada à participação desse órgão na percepção de estímulos direcionados ao processo reprodutivo, bem como detecção de condições ambientais adequadas para a transferência dos espermatozoides.

Internamente, no segundo gonópodo, observou-se apenas presença de musculatura estriada e tecido conjuntivo frouxo, não sendo observadas as glândulas em roseta. Assim, esse órgão não apresentaria função secretora. Em secções histológicas longitudinais observou-se que em Thoracotremata, que a face do segundo gonópodo voltada para o abdômen apresentou-se pregueada longitudinalmente com a cutícula menos espessa, provavelmente menos rígida, permitindo a movimentação do endopodito durante o processo de bombeamento. De acordo com Elner et al. (1985) esse bombeamento seria resultante da movimentação do abdômen durante a cópula. Nas espécies analisadas no presente trabalho,

esse bombeamento provavelmente seja auxiliado pela musculatura estriada longitudinal presente no interior do segundo gonópodo. Assim, constatou-se que os gonópodos de forma geral, além de atuarem na produção do sêmen, também apresentariam caraterísticas que sugereria a função de mecano e quimiorrecepção.

AGRADECIMENTOS

Esta pesquisa foi apoiada pela FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) (Processo n° 2009/52821-2). Os autores agradecem aos técnicos Antônio Teruyoshi Yabuki, Monika Iamonte, Pablo Barros Brito e Robson Jesus pelo apoio no processamento e análise do material.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALTNER, J.; HATT, H.; ALTNER, J. Structural properts of bimodal chemo- and mechanosensitive setae on the pereiopod chelae of the crayfish, *Austropotamobius torrentium.* **Cell and Tissue Research**, v. 228, 357-374, 1983.

ANGER, K. **The Biology of Crustacean Decapoda Larvae**. Krip, Meppel. The Netherlands, 2001, 405p.

BAKER, J. R. The histochemical recognition of lipine. **Quarterly Journal of Microscopical Science.** v. 87, p. 441-470, 1946.

BAUER, R. T. Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. **Journal of Crustacean, Biology,** v. 6, p. 313–325, 1986.

BAWAB, F. M.; EL-SHERIEF, S. S. Contributions to the study of the origin, nature and formation of the plug in the spermatheca of the female crab *Portunus pelagicus*, **Crustaceana**, v. 57, p. 9–24, 1989.

BECKER, C.; TURKAY, M.; BRANDIS, D. The male copulatory system of European Pea Crabs (Crustacea, Brachyura, Pinnotheridae**). Journal fo morphology**, v. x, p. x-x, 2012.

BENINGER, P. G.; ELNER R. W.; POUSSART Y. Gonopods of the majid crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius). **Journal of Crustacean Biology,** v. 11, p. 217–228, 1991.

BENINGER, P. G.; LANTEIGNE, C.; ELNER, R. W. 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**, v. 13, p. 1–16, 1993.

BENINGER, P. G., LAROCQUE, R. Gonopod tegumental glands. A new accessory sex gland in the Brachyura. **Marine Biology (Berlin).** v. 132, n. 3, p. 435-444, 1998.

BRANDIS, D.; STORCH, V.; TURKAY, M. Morphology and function of the copulatory system in freshwater crabs of the genus *Potamon*. **Journal of Morphology**, v. 239, p. 157-166, 1999.

ELNER, R. W.; GASS, C. A.; CAMPBELL, A. Mating behaviour of the jonah crab, *Cancer borealis* Stimpson (Decapoda, Brachyura). **Crustaceana,** v.14, p. 34–39, 1985.

FELGENHAUER, B. E. External Anatomy and Integumentary Structures. – In: Harrison, F. W., Hume, A. G. (Eds). Microscopic Anatomy of Invertebrates: Decapod Crustacea. New York, v. 10, p. 7 – 43, 1992.

GARCIA, T. M.; SILVA, J. R. F. Sperm cell development of the red-clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata* Latreille, 1803) (Crustacea: Decapoda: Grapsidae). **Arquivos de Ciências do Mar,** v. 42, p. 36-39, 2009.

GARM, A. Revising the definition of the crustacean seta and setal classification systems based on examinations of the mouthpart setae of seven species of decapods. **Zoological Journal of the Linnean Society,** v. 142, p. 233–252, 2004.

GURAYA, S. S. **Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals.** Springer-Verlag, New York, New York. 1987, Pp. 1-429.

GUINOT, D. Propositions pour une nouvelle classification des Crustacés Décapodes Brachyoures. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences, Série D. Sciences Naturelles**, v. 285, p. 1049–1052, 1977.

GUINOT D. Principes d'une classification évolutive des Crustacés Décapodes Brachyoures. **Bulletin biologique de la France et de la Belgique**, v. 112, p. 211-292, 1978**.**

HARTNOLL. R. G. Copulatory structure and function in the Dromiacea, and their bearing on the evolution of Brachyura. **Pubblicazione de la Stazione Zoologica di Napoli**, v. 39, p. 657–676, 1975.

JOHNSON, B.; TALBOT, P. Ultrastructural analysis of the pleopod tegumental glands in male and female lobster, *Homarus americanus.* **Journal of Crustacean Biology**. V. 7, p. 288-301, 1987.

JOHNSON, P. T. **Histology of the blue crab, *Callinectes sapidus*: a model for the Decapoda.** New York, Praeger, 1980

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia.** São Paulo: Livraria e Editora Santos, 1983, 123p.

KITTREDGE, J. S.; TERRY, M.; TAKAHASHI, F. T. Sex pheromone activity of the molting hormone, crustecdysone, on male crabs (*Pachygrapsus crassipes, Cancer antennarius,* and *C. anthonyi*). **Fishery Bulletin**, v. 69, p.337-343, 1971.

LAUTENSCHLAGER, A,; BRANDIS, D.; STORCH V. Morphology and function of the reproductive system of representatives of the genus *Uca*. **Journal of Morphology**, v. 271, p. 1281–1299, 2010.

LEITE, M. M. L. **Relações morfométricas para a compreensão de aspectos reprodutivos do caranguejo – Uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), no estuário do rio Coreaú-Ceará**.

2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará. 2005.

LIRA, J. P. R. de. **História de vida do caranguejo *Goniopsis cruentata* (Latreille, 1803) em um manguezal do nordeste brasileiro.** 2012. Dissertação (Mestrado do Programa de Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará. 2012

MARTIN, G. G.; HOSE, J. E. Vascular elemets and blood (hemolymph). In HARRISON, F. W., HUMES, A. G. (Eds). **Microscopic anatomy of invertebrates,** v. 10, Crustacea, Decapoda, Wiley-Liss, New York. 1992, p. 117-146.

MARTIN, J. W.; ABELE, L. Notes on male pleopod morphology in the Brachyuran crab Family *Panopeidae* Ortmann, 1893, Sensu Guinot (1978) (Decapoda). **Crustaceana,** v. 50, n. 2, p 182-198, 1986.

MOYANO, M. P. S.; GAVIO, M. A.; CUARTAS, E. I. Copulatory system of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea: Brachyura: Majoidea**). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdon**. v. 91, n. 8, p. 1617-1625, 2011.

NASCIMENTO, H. L. de. **Biologia reprodutiva do caranguejo *Uca maracoani* (Latreille, 1802) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) no estuário do Rio Jaguaribe, Aracati - Ceará**. 2011. Monografia (Bacharelado em Ciências Biologicas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2011.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry: Theoretical and Applied**, Vol. 2. Jet. Churchill Ltda, London, 1960, p. 965.

PHILLIPS, B. F.; MACMILLAN, D. L. Antennal receptors in puerulus and postpuerulus stages of the rock lobster *Panulirus cygnus* (Decapoda: Palinuridae) and their potential role in puerulus navigation. **Journal of Crustacean Biology**, v. 7, p. 122-135, 1987.

RYAN, E. P. Pheromone: evidence in a decapod crustacean. **Science**, v. 151, p. 340-341, 1966.

MASON, J. C. 1970. Egg-laying in the western North American crayfish, *Pacifastacus trowbridgii* (Stimpson) (Decapoda, Astacidae). **Crustaceana**, v. 19, p. 37-44, 1970.

RYAN, E. P.Structure and function of the reproductive system of the crab *Portunus sanguinolentus* (Herbst) (Brachyura: Portunidae). II. **The Female system. Proc. Symp. Crustacea Mar. Biol. Asso**, India., p. 522-544, 1967.

SAINT LAURENT, M. De. Sur la classification et la phylogénie des Crustacés Décapodes brachyoures. II. Heterotremata et Thoracotremata Guinot, 1977. **Comptes rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences,** Paris, v. 290, p. 1317–1320, 1980.

SEIFERT, P. Studies on the sex pheromone of the shore crab, *Carcinus maenas*, with special regard to ecdysone excretion. **Ophelia,** v. 21, p. 147-158, 1982.

SHINOZAKI-MENDES, R. A.; SILVA, J. R. F.; HAZIN, F. H. V. Development of male reproductive system of the blue land crab *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1828 (Decapoda: Gecarcinidae). **Acta Zoologica (Stockholm),** v. 93, p. 390-399, 2012.

SPALDING, J. F. The nature and formation of the spermatophore and spem plug in *Carcinus maenas*. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 83, p. 389-423, 1942.

TSUCHIDA, S.; FUJIKURA, K. Heterochely, relative growth, and goopod morphology in the bythograeid*, Austinograea williamsi* (Decapoda, Brachyura). **Journal of Crustacean Biology**, v. 20, n. 2, p. 407-414, 2000.

TÜRKAY, M. O. Morphologisch-taxonomische Monographie der Gecarcinidae. Ein Beitrag zur vergleichenden Morphologie der Brachyura (Crustacea: Decapoda). 1983. **Inaugural-Disertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften vorgelegt beim Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe Universität zu Frankfurt am Main**. 1983, p. 1–111.

VITTORI, M., ZNIDARSIC, N., KOSTANJSEK, R. STRUS, J. Microscopic anatomy of male tegumental glands and associated cuticular structuresin *Titanethes albus* (Crustacea: Isopoda). **Arthropod Structure & Develpment**, v. 41, p. 133-144, 2012.

DISCUSSÃO GERAL

VI. DISCUSSÃO GERAL

Em Eubrachyura, os ovários comunicam-se com o receptáculo seminal por meio de um curto oviduto. Este pode se ligar dorsal ou ventralmente ao receptáculo seminal. Entretanto, McLay e Lopez-Greco (2011) relataram também a ocorrência dessa ligação na região intermediária (mediana) do receptáculo seminal. A posição da ligação ovário-receptáculo seminal influenciaria no mecanismo de fertilização. Em espécies de ligação ventral, os espermatozóides a serem utilizados na fertilização seriam preferencialmente originados da última cópula, devido a localização ventral no receptáculo, próxima a ligação com o oviduto. Já em espécies de ligação dorsal os espermatozóides provenientes da primeira cópula seriam os preferencialmente utilizados na fertilização (BRINK; MCLAY, 2009; MCLAY; LOPEZ-GRECO, 2011). Essa hipótese foi reforçada pela ausência de estruturas como cílios, musculatura conspícua no revestimento do receptáculo seminal, bem como de flagelos nos espermatozóides que pudessem promover a movimentação do conteúdo espermático.

Apesar de no presente trabalho não ter sido registrado o local exato da fertilização, ou seja, ocorrendo interna ou externamente ao sistema reprodutor, pode-se inferir a respeito desse local de ocorrência. Dados a respeito do tempo necessário para a fertilização em crustáceo Decapoda, confrontados com o tempo de desova das espécies analisadas, permitiram concluir que seria mais provável que a fertilização tivesse inicio no interior do

receptáculo e fosse concluída no abdômen das fêmeas, como sugerido também por Ryan (1967), Hinsch (1971) e Lee e Yamazaki (1990).

As características macroscópicas do ducto genital feminino de Eubrachyura permitiram dividi-lo em quatro regiões: oviduto, receptáculo seminal, vagina e abertura genital (gonoporo ou vulva), padrão este descrito por Hartnoll (1968).

Histologicamente, foi possível observar diferenças nos constituintes tissulares de cada região. O receptáculo seminal apresentou-se revestido por tecido epitelial apoiado em tecido conjuntivo frouxo. Neste último observou-se a presença de miofibroblastos que além de produzirem fibras do conjuntivo teriam no seu interior elementos com função nos processos de contração (ROSS et al., 1993). Além destas células, no tecido conjuntivo também se observou a presença de hemócitos hialinos e granulócitos, células com função de reconhecimento e remoção de material estranho, bem como na coagulação da hemolinfa (MARTIN; HOSE, 1992).

O receptáculo seminal apresentou-se como uma câmara simples e sem subdivisões, sendo nítida a diferença entre o epitélio mediano-dorsal (secretor) e ventral (presença de cutícula). De maneira geral, observou-se a predominância de espécies com a porção secretora constituída de epitélio simples em Thoracotremata e estratificado em Heterotremata. A diferença na extensão do epitélio revestido por cutícula entre Podotremata e Eubrachyura, refletiu em diferenças na quantidade de espermatozóides estocados, como também sugerido por McLay e Lopez-Greco (2011), onde espécies em que o órgão de armazenamento de espermatozoides seria revestido internamente apenas por epitélio cuticular (Podotremata) possuiriam sua expansão limitada. Já em espécies cuja região estivesse desprovida de uma íntima cutícular, a expansão do órgão de armazenamento seia maior e comportaria um volume maior de espermatozóides.

No lúmen dos receptáculos seminais, a presença tanto de espermatozóides livres, como envoltos por espermatóforos nos receptáculos seminais sugeriram a utilização gradual dos espermatozóides pela fêmea, corroborando com Beninger et al. (1988) que estudaram *C. opílio.* A presença de espermatozóides em diferentes estágios de maturação também sugeriria a utilização gradual destes. Em *U. cordatus* e *M. nodofrons* observou-se no interior do receptáculo seminal a presença de espermatozóides maduros e de células germinativas ainda com o citoplasma desenvolvido. Provavelmente, o macho transferiria espermatozóides em diferentes estágios de maturação, sinalizando a utilização gradual deles à medida que estes maturassem ou em períodos reprodutivos diferentes. Em *E. gonagra* e *G. cruentata* observou-

se espermatózoides irregulares e sem acrossomo ou acrossomo pouco visível, provavelmente em degeneração.

A histologia do oviduto demonstrou pequena variação nos seus constituintes tissulares, sendo geralmente observado epitélio pavimentoso ao longo de todo o órgão, exceto em *U. maracoani*, cujo epitélio apresentou-se colunar. Nos Thoracotremata o local de ligação do oviduto com o receptáculo seminal apresentou um aglomerado de células que se projetou para o lúmen deste. Esta estrutura teria como função impedir a entrada de espermatozóides no lúmen ovariano (LEE; YAMAZAKI, 1990), além de secretar substâncias que atuaria no processo de fertilização (LAUTENSCHLAGER et al. 2010).

Assim como descrito por Hartnoll (1968), o presente trabalho também demonstrou dois padrões na forma da vagina de diferentes espécies de Brachyura: simples e côncavo. Em Heterotremata a vagina poderia apresentar-se simples ou côncava. Em Thoracotremata observou-se apenas vaginas côncavas. A presença de musculatura estriada associada a parede invaginada em padrões côncavos, permitiria a fêmea controlar o grau de abertura da vagina, minimizando a perda de fluidos e permitindo o controle da fertilização e da desova (LAUTENSCHLAGER et al., 2010). Durante a cópula, essa musculatura, juntamente com a presença do opérculo na vulva, teriam a função de controlar a penetração do órgão copulatório masculino (gonópodo), sugerindo que a fêmea teria uma participação ativa no processo de cópula (BECKER et al., 2011). O formato da vagina e dos gonóporos, juntamente com as características observadas na região distal dos primeiros gonopodos masculino, sugereriram a ocorrência de um mecanismo de chave-fechadura do processo reprodutivo, onde os machos só conseguiriam copular com as fêmas de sua respectiva espécie. Nos Thoracotremata e no Heterotremata *E. gonagra* observou-se a presença de um opérculo na abertura genital, este geralmente rígido que sofreria descalcificação e tornar-se-ia flexível. Este processo permitinde sua abertura durante a cópula, como também sugerido por Hartnoll (1969).

O "plug" espermático foi observado apenas em *E. gonagra* e *C. guanhumi*, sugerindo-se as funções de proteção e retenção dos espermatozóides no receptáculo seminal (RYAN, 1967); nutrição dos espermatozóides durante sua estocagem (ADIYODI; ANILKUMAR, 1988); e mecanismo de prevenção da paternidade de certos caranguejos, prevenindo a introdução (no receptáculo seminal da fêmea) de espermatozoides provenientes de cópulas subsequentes (DIESEL, 1989). Hartnoll (1969) sugere que o "plug" é uma estrutura vestigial sem função importante.

Os espermatozoides seriam transferidos para os ductos genitais por meio da interação do primeiro com o segundo gonópodo. Em Thoracotremata, durante a cópula, este segundo par atuaria como um pistão, se inserindo no canal ejaculatório do primeiro gonópodo. Este canal se estende desde a sua região basal até a abertura presente na região apical do primeiro gonópodo (SPALDING, 1942; RYAN, 1967; BAUER, 1986; BENINGER et al., 1991). Nas espécies cujo segundo gonópodo é curto, sugeriu-se que a função principal de transferir os espermatozóides para os ductos genitais da fêmea seria do primeiro gonópodo, tendo o segundo a de auxiliar ou de bombeamento. A presença de musculatura estriada longitudinal nos protopodito dos goópodos sugerem essa função. Em espécies cujo segundo gonópodo foi maior do que o primeiro, como nos Heterotremata *E. gonagra* e *M. nodifrons* sugeriu-se que o primeiro teria a função de estabilizar o segundo gonópodo longo, sendo este introduzido na vagina da fêmea e responsável pela transferência dos espermatozoides, assim como descrito para caranguejos do gênero *Potamon* por Brandis et al (1999).

No interior dos primeiros gonópodos de todas as espécies aqui analisadas, observou-se a presença de glândulas tegumentares em forma de roseta. A localização destas glândulas nos primeiros gonópodos de Brachyura foi preferencialmente proximal no endopodito, como observado nas espécies analisadas no presente estudo e para as espécies *Portunus sebae, Ovalipes ocellatus, Cancer irroratus, Grapsus grapsus, Petrolisthes armatus* (BENINGER; LAROCQUE, 1998), *Pinnotheres pisum, P. pectunculi, Nepinnotheres pinnotheres* (BECKER et al., 2012) e *Chionoecetes opilio* (BENINGER et al., 1991). Apenas em duas espécies essa glândula foi observada localizada distalmente no primeiro gonópodo, em *Carcinus maenas* (BENINGER; LAROCQUE, 1998) e *Libinia spinosa* (MOYANO et al., 2011).

Por se localizar na região próxima a abertura basal do primeiro gonópodo, seria possível que as secreções provenientes dessa glândula, atuariam como lubrificante para facilitar a inserção do segundo gonópodo no primeiro, bem como executar movimento de bombeamento do espermatozoide pelo canal espermático (MOYANO et al., 2011). Além do mais por estar localizada no órgão copulatório, poder-se-ia considerar a hipótese de que essa também teria como função a secreção de substâncias que atuariam na receptividade dos machos pelas fêmeas ou até mesmo na secreção de ferormonios.

A projeção apical presente nos primeiros gonópodos de *U. cordatus*, *G. cruentata, U. maracoani* e *C. guanhumi,* teria como função promover a abertura e o encaixe no gonóporo da fêmea. Através da abertura do canal ejaculatório, os espermatozóides seriam

transferidos para a vagina. Em *C. gunahumi* essa projeção possivelmente atuaria na eliminação dos espermatozóides dos machos que pudessem ter copulado com a fêmea previamente, garantindo a fertilização dos ovócitos pelos seus espermatozóides e impedindo a fertilização por outro macho, caracterizando uma competição espermática. Em *E. gonagra* e *C. bocourti* a porção distal do primeiro gonópodo seria filamentosa e não possuiria setas, permitindoa inserção desta região na vagina da fêmea.

Já a região apical dos segundos gonópodos de Thoracotremata e *C. bocourti*, apresentou forma arredondada, tendo como função selar o canal espermático durante o bombeamento do esperma no primeiro gonópodo, evitando o extravasamento de líquido seminal durante a cópula (BENINGER et al. 1991; MOYANO et al. 2011). Por meio da histologia constatou-se que este apêndice não apresenta canal ejaculatório e nem glândulas tegumentais em roseta.

Distribuidas pela superficie dos gonópodos, foram evidenciadas cinco tipos de setas: simples, paposa, paposerrada (classificação sugerida por GARM, 2004), conada (classificação de THOMAS, 1970) e remiforme. As mais comuns e mais numerosas seriam as do tipo simples e paposa, presentes em todas as espécies aqui estudadas.

As setas do tipo simples teriam como função estabilizar e auxiliar no encaixe do gonópodo ao gonóporo feminino, mecanoreceptora (BENINGER et al., 1991) e protegeria os gonópodos contra eventos danosos (MOYANO et al., 2011). Além destas funções, constatou-se que estas setas também apresentariam a função quimioreceptora devido a presença de um lúmen que estaria separado do exterior por fina cutícula (ANGER, 2001). Adicionalmente, constatou-se também que estas setas estariam associadas a grupamentos de células localizadas abaixo da cuticula, com possível função sensorial. Altner et al., (1983) descreveram as setas sensoriais nas quelas do lagostin *Austropotamobius torrentium.* De acordo com esses autores, cada uma seria inervada por oito células sensoriais bipolares, onde segmentos dos dendritos se estenderiam até o ápice da seta. Destas células, duas seriam mecanoreceptoras e as demais quimiorreceptoras. A função de quimiorrecepção presente nos primeiros gonópodos poderia estar relacionada à participação desse órgão na percepção de estímulos relacionados ao processo reprodutivo, bem como as condições ambientais adequadas para a transferência dos espermatozoides.

Na região basal, observou-se principalmente setas do tipo paposa, presentes principalmente no poro basal do canal espermático no primeiro gonópodo e na região

proximal do segundo gonópodo. A presença de um grande número de sétulas nas setas paposa dessa região, formaria uma barreira na retenção de detritos, impedindo a entrada de materiais no canal ejaculatório, limitando o fluxo do esperma no primeiro gonópodo. As sétulas, dependendo de seu tamanho e densidade, poderiam atuar como um filtro ou como uma escova (POHLE; TELFORD, 1981).

Nos segundos gonópodos dos Thoracotremata e dos Heterotremata *C. bocouti*, observou-se projeções localizadas ou na borda da região distal ou no "appendix masculina", variando de tamanho, forma e quantidade entre as espécies, sendo numerosas e apresentando a forma de dentículos em *C. guanhumi, G. cruentata, U. maraconai* e mais robustos em *C. bocourti*. Duas hipóteses a respeito das funções poderiam ser atribuídas a estas estruturas: 1) romper a fina membrana que forma os espermatóforos, durante seu bombeamento, prermitindo a transferência de alguns espermatózoides livres para o receptáculo seminal; ou 2) atuar como mecanismo que impede a perda de espermatozóides durante o bombeamento do líquido seminal, através da retenção dos espermatóforos nos espaços entre essas projeções, impedindo o extravasamento destes pelo poro basal. Nos Heterotremata essa função provavelmente seria desempenhada pelas projeções alongadas e revestidas com dentículos que circundam parcialmente o gonópodo de *E. gonagra* e em forma de meia-lua em *M. nodifrons*.

Em Brachyura observou-se um aumento de complexidade na organização do sistema reprodutor feminino. Em Podotremata, os ovários abriram-se para o exterior por meio de um simples ducto, enquanto que em Eubrachyura este ducto se especializou, adquirindo dilatações para permitir o estoque de espermatozóides. Essas dilatações poderiam ser consideradas uma sinapomorfia de Eubrachyura, sendo o estado apormórfico, os ductos genitais simples, como observado nos Anomura, táxon considerado grupo irmão dos caranguejos Brachyura. Essa tendência foi sugerida por Bauer (1986) para os Pleocyemata, táxons cujas fêmeas incubariam seus ovos na região abdominal (ex. camarões Carideos, Anomura, Brachyura). Segundo o autor observou-se uma tendência geral no aumento da complexidade das genitálias femininas, partindo de Stenopodidea e Caridea, que atingiu sua derivação máxima em Brachyura.

Tanto nos receptáculos seminais femininos, como os gonópodos masculinos, observou-se tendências evolutivas. Lopez-Greco e McLay (2011) sugeriram que em Eubrachyura, os receptáculos seminais do tipo dorsal, reteriam a condição ancestral, enquanto os do tipo ventral seriam derivados. Similarmente, a mesma tendência seria observada para a

forma da vagina. Hartnoll (1968) sugeriu que a vagina do tipo simples seria a forma basal, enquanto que a côncava a derivada e esta teria evoluído da forma simples uma ou diversas vezes. Observou-se uma predominância de características primitivas em Heterotremata e derivadas em Thoracotremata, podendo sugerir uma tendência evolutiva desses caracteres. Com relação aos gonópodos, Hartnoll (1975) sugeriu a diminuição do segundo gonópodo como uma tendência evolutiva. Ao se analisar os dados obtidos no presente trabalho, somados aos resultados obtidos em outros estudos, poder-se-ia confirmar essa tendência. Os representantes dos Thoracotremata, grupo considerado mais derivado, apresentaria o segundo gonópodo menor do que o primeiro (LAUTENSCHLAGER et al., 2010; BECKER et al, 2012). Em Heterotremata observando-se indivíduos de segundo gonópodos maiores ou menores que o primeiro gonópodo (BENINGER et al., 1991; MOYANO et al., 2011; SPALDING, 1942; TSUCHIDA; FUJUKURA, 2000; BRANDIS et al., 1999).

A partir deste estudo morfológico dos ductos genitais femininos e gonópodos masculinos de caranguejos Eubrachyura, foi possível compreender melhor como a transferência dos espermatozóides dos machos para as fêmeas, bem como o processo de fertilização, bem como a transferência dos espermatozoides dos machos para as fêmeas, observando os diferentes padrões para estas estruturas, relacionados com a evolução do táxon. Estudos com esse enfoque comparativo são ainda escassos para espécies de Eubrachyura do litoral brasileiro. As informações da presente pesquisa fomentarão desenvolvimento de planos de manejos mais acurados para espécies economicamente importantes. Cabe a pesquisas futuras, analisar a relação dos ductos genitais femininos e dos gonópodos com aspectos da biologia reprodutiva, tais como o ciclo gonadal e maturidade.

CONCLUSÕES

VII. CONCLUSÕES

Usando como ferramenta a análise morfohistologica dos ductos genitais femininos e dos gonopodos masculinos de caranguejos Eubrachyura, o presente trabalho mostrou que:

1) Anatomicamente, o sistema reprodutor feminino de Eubrachyura segue um padrão, consistindo de um par de ovários alongados e um par de ductos genitais que se estendem até o exterior, sendo os últimos constituídos de quatro regiões distintas: oviduto, receptáculo seminal, vagina e gonóporo (abertura genital ou vulva).

2) As características histológicas encontradas nos ductos genitais femininos, principalmente a forma da vagina e o tipo de epitélio secretor do receptáculo seminal, sinalizaram que estes estão relacionados com a filogenia do táxon, onde se observou características consideradas basais em Heterotremata e derivadas em Thoracotremata.

3) As características do processo de fertilização e de oviposição de Eubrachyura permitiram inferir que o processo de fertilização inicia-se no receptáculo seminal e concluí-se nos pleópodos.

4) Em todas as espécies analisadas, observou-se que o sistema copulatório de caranguejos Eubrachyura é formado por dois pares de gonópodos, constituídos por dois segmentos: um basal e largo – protopodito; e um distal e alongado – o endopodito.

5) Em Thoracotremata observou-se a presença de uma projeção cuticular na porção apical do primeiro gonópodo com forma similar aos gonóporos femininos das

respectivas espécies e agindo como um mecanismo do tipo chave-fechadura, que impede que as fêmeas seja fertilizadas por machos de outras espécies.

6) Cinco tipos de setas foram observados nos gonópodos de caranguejos Eubrachyura, atuando na quimio, mecanorecepção, proteção contra eventos danosos e na filtragem de partículas que dificultem o fluxo de espermatozóides no ducto ejaculatório.

7) Observou-se a presença de um lúmen nas setas dos gonópodos de Eubrachyura. Em algumas espécies, o lúmen está separado do ambiente por uma fina camada de cutícula e de células sensoriais na hipoderme, reforçando a hipótese de função quimiorreceptora

8) Histologicamente, os gonopodos das espécies de caranguejos Eubrachyura analisados apresentaram pouca variação, sendo constatada a presença de glândulas tegumentais em forma de roseta no primeiro gonópodo com função na produção do sêmem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIYODI, K. G.; ANILKUMAR. G. Arthropoda-Crustacea. In**:** ADIYODI K. G.; ADIYODI, R. G. **Reproductive biology of invertebrates, v.3 Accessory Sex Glands.** NEW YORK: Wiley-Liss, 1988.

ADIYODI, R. G., SUBRAMONIAM. T. Arthropoda Crustacea. In: ADIYODI, K. G., ADIYODI, R. G. **Reproductive Biology of Invertebrates**. John Wiley & Sons Ltd., v. 1, 1983, p. 443-495.

AHYONG, S. T.; LAI, J. C. Y.; SHARKEY, D.; COLGAN, D. J.; NG, P. K. L. Phylogenetics of the brachyuran crabs (Crustacea: Decapoda): The status of Podotremata based on small subunit nuclear ribosomal RNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 45,2007, p. 576–586.

ALTNER, J.; HATT, H.; ALTNER, J. Structural properts of bimodal chemo- and mechanosensitive setae on the pereiopod chelae of the crayfish, *Austropotamobius torrentium.* **Cell and Tissue Research**, v. 228, 357-374, 1983.

ANGER, K. **The Biology of Crustacean Decapoda Larvae**. Krip, Meppel. The Netherlands, 2001, 405p.

ANIKUMAR, G.; ADIYODI, K. G. Spermatheca of the fresh water crab*, Paratelphusa hydrodromus* (Herbst) in relation to the ovarian cycle. In: ADIYODI, K. G., ADIYODI, R. G. (eds) **Advances in invertebrate reproduction.** Peralom-Kenoth, Kerala, 1977.

ANILKUMAR, G.; SUDHA, K.; ANITHA, E.; SUBRAMONIAM, T. Aspects of sperm metabolism in the spermatheca of the brachyuran crab *Metopograpsus messor*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 16, n. 2, p. 310-314, 1996.

BAKER, J. R. The histochemical recognition of lipine. **Quarterly Journal of Microscopical Science.** v. 87, p. 441-470, 1946.

BARROS, T. B. **Fecundidade e desenvolvimento embrionário inicial do caranguejo aratu *Goniopsis cruentata* (Decapoda: Brachyura: Grapsidae), no manguezal do Rio Jaguaribe.** 2007. 50p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Brasil, 2007.

BAUER, R. T. Phylogenetic trends in sperm transfer and storage complexity in decapod crustaceans. **Journal of Crustacean Biology**, v. 6, p. 313–325, 1986.

BAWAB, F. M., EL-SHERIEF, S. S. Contributions to the study of the origin, nature and formation of the plug in the spermatheca of the female crab *Portunus pelagicus*, **Crustaceana**, v. 57, p. 9–24, 1989.

BECKER, C.; BRANDIS, D.; STORCH, C. Morphology of the female reproductive system of European pea crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Pinnotheridae). **Journal of Morphology**, v. 272, n. 1, p. 12-26, 2011.

BECKER, C.; TURKAY, M.; BRANDIS, D. The male copulatory system of European Pea Crabs (Crustacea, Brachyura, Pinnotheridae). **Journal of Morphology**, v. x, p. x-x, 2012

BECKETT, B. S. **Biology: A modern introduction.** GCSE Edition. 1986, 328p.

BENHALIMA, K.; MORIYASU, M. Prevalence of bacteria in the spermathecae of female snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura: Majidae). **Hydrobiologia,** v. 449, p. 261-266, 2001.

BENINGER, P. G., LAROCQUE, R. Gonopod tegumental glands. A new accessory sex gland in the Brachyura. **Marine Biology (Berlin).** v. 132, n. 3, p. 435-444, 1998.

BENINGER, P. G.; ELNER R. W.; POUSSART Y. Gonopods of the majid crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius). **Journal of Crustacean Biology.** v. 11, p. 217–228, 1991.

BENINGER. P. G.; ELNER, R. W.; FOYLE, T. P.; ODENSE, P. H. Funcional anatomy of the male reproductive system and female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. **Journal of Crustacean Biology**, v. 8, n. 3, p. 322-332, 1988.

BENINGER, P. G.; LANTEIGNE, C.; ELNER, R. W. 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**, v. 13, p. 1–16, 1993.

BINFORD R. The germ-cells and the process of fertilization in the crab *Menippe mercenaria*. **Journal of Morphology**., v. 24, p. 147–202, 1993.

BISHOP, G. A.; FELDMANN, R. M.; VEGA, F. The Dakoticancridae (Decapoda, Brachyura) from the Late Cretaceous of North America and Mexico. **Contributions to Zoology,** v. 67, n. 4, p. 237–255, 1998.

BRANDIS, D.; STORCH, V.; TURKAY, M. Morphology and function of the copulatory system in freshwater crabs of the genus *Potamon.* **Journal of Morphology**, v. 239, p. 157-166, 1999.

BRINK, A. M.; MCLAY, L. C. Use of the sterile male technique to investigate sperm competiton storage, and use in a pill box crab, *Halicarcinus cookii*. (Brachyura: Hymenosamatidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 29, n.1, p. 62–69, 2009.

BRÖSING, A.; RICHTER, S.; SCHOLTZ, G. Phylogenetic analysis of the Brachyura (Crustacea, Decapoda) based on characters of the foregut with establishment of a new taxon. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 45, p. 20-32, 2007.

BROWN, G. G. Ultrastructural studies of sperm morphology and sperm-egg interaction in the Decapod *Callinectes sapidus*. **Journal of Ultrastructure Research***,* v. 14, p. 425-40, 1966.

BRUSCA, R. C.; BRUSCA. G. J. Invertebrates. Sunderland. Massachussets, USA: Sinaver Associates Inc. Publishers, 2009, 922 p.

CHRISTOFFERSEN, M. L. Phylogenetic systematica of Eucarida (Crustacea Malacostraca). **Revista Brasileira de Zoologia**. v, 5, n. 2, p. 325-351, 1988.

DE GRAVE, S.; PENTCHEFF, N. D.; AHYONG, S. T.; CHAN, T. Y.; 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 classification of living and fossil genera of decapod crustaceans. **Raffles Bulletin of Zoology**, n. 21, p. 1-109, 2009.

DIAS NETO, J. (Org). Proposta de Plano Nacional para o uso sustentável do caranguejo-uçá, guaiamum e do siri-azul. IBAMA - Série Plano de Gestão Recursos Pesqueiros, 2.ed., . Brasília. 2011, 156p.

DIESEL, R. Discrete Storage of Multiple-Mating Sperm in the Spider Crab *Inachus phalangium*. **Naturwissenschaften,** v. 75, p. 148- 149, 1988.

DIESEL, R. Sperm competition and reproductive success in a decapod *Inachus phalangium* (Majidae): a male ghost spider crab that seals off rivals' sperm. **Journal of Zoology**. v. 220, p. 213-224, 1989.

DULUC, C.; SAINTE-MARIE, B.; BRETHES, J. C. Value of indicators for assessing recent mating in brachyuran crabs. ***Journal* of the Marine Biological Association of the United Kingdom,** v. 85, p. 129-135, 2005.

ELNER, R. W.; GASS, C. A.; CAMPBELL, A. Mating behaviour of the jonah crab, *Cancer borealis* Stimpson (Decapoda, Brachyura). **Crustaceana**, v.14, p. 34–39, 1985.

FARMER, A. S. The functional morphology of the mouth- parts and pereiopods of *Nephrops norvergicus* (I,.) (Decapoda: Ncphropidae). **Journal of Natural History,** v. 8, p. 121-142, 1974.

FELGENHAUER, B. E. External Anatomy and Integumentary Structures. – In: Harrison, F. W., Hume, A. G. (Eds). Microscopic Anatomy of Invertebrates: Decapod Crustacea. New York, v. 10, p. 7 – 43, 1992.

FINCHAM, A. A. Eyes and the classification of the malacostracan crustaceans. **Nature**, v. 287, p. 729–731, 1980.

FINCHAM, A. A. Ontogeny and optics of the eyes of the common prawn *Palaemon* (Palaemon) *serratus* (Pennant, 1777**). Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 81, p. 89 – 113, 1984.

GARCIA, T. M.; SILVA, J. R. F. Sperm cell development of the red-clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata* Latreille, 1803) (Crustacea: Decapoda: Grapsidae). **Arquivos de Ciências do Mar,** v. 42, p. 36-39, 2009.

GARCIA-GUERRERO, M.; HENDRICKX, M. E. Embryology of decapod crustaceans I. Embryonic development of the mangrove crabs *Goniopsis pulchra* and *Aratus pisonii* (Decapoda: Brachyura). **Journal of Crustacean Biology**, v. 24, p. 666-672, 2004.

GARM, A. Revising the definition of the crustacean seta and setal classification systems based on examinations of the mouthpart setae of seven species of decapods. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 142, p. 233–252, 2004.

GEORGE, R.W. Comparative morphology and evolution of the reproductive structures in spiny lobsters, *Panulirus*. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research**, v. 39, p. 493–501, 2005.

GILBERT S. F. Developmental biology, 8° ed. Sinauer, Sunderland, 2006.

GLAESSNER, M. F. Decapoda. In: Moore, R.C. (ed**.), Treatise on invertebrate paleontology, Part R, Arthropoda 4**. Vol. 2. Geological Society of America and University of Kansas Press, 1969.

GÓES, J. M. de. **Biologia do caranguejo *Eriphia gonagra* (Fabricius,1781) (Crustacea, Brachyura, Xanthidae) na região de Ubatuba, São Paulo. 2000.** Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Zoologia) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, São Paulo, Brasil, 2000.

GONZÁLEZ-GURRIARÁN, E.; FERNÁNDEZ, L.; FREIRE, J.; MUINO, R. Mating and the role of seminal receptacles in the reproductive biology of the spider crab *Maja squinado* (Decapoda, Majidae). **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 220, p. 269–285, 1998.

GOUDEAU, M. Fertilization in a crab (*Carcinus maenas*). I. Early events in the ovary, and cytological aspects of the acrosome reaction and gamete contacts. **Tissue and Cell**, v. 14, p. 97-112, 1982.

GUINOT D. Principes d'une classification évolutive des Crustacés Décapodes Brachyoures. **Bulletin biologique de la France et de la Belgique**, v. 112, p. 211-292, 1978**.**

GUINOT D.; JAMIESON, B. G. M.; RICHER DE FORGES, B. Relationship of Homolidae and Dromiidae: evidence from sperma- tozoal ultrastructure (Crustacea, Decapoda). **Acta Zoologica,** v. 75, p. 255–267, 1994.

GUINOT, D. 1993. Données nouvelles sur les crabes primitifs (Crustacea Decapoda Brachyura Podotremata). Comptes Rendus de l'Académie de Sciences, Paris, v. 316, p. 1225–1232.

GUINOT, D. Propositions pour une nouvelle classification des Crustacés Décapodes Brachyoures. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences, Série D. Sciences Naturelles**, v. 285, p. 1049–1052, 1977.

GUINOT D.; JAMIESON, B. G. M.; RICHER de FORGES, B.; TUDGE, C. C. Comparative spermatozoal ultrastructure of the three dromiacean families exemplified by *Homolodromia kai* (Homolodromiidae), *Sphaerodromia lamellata* (Dromiidae), and *Dynomene tanensis* (Dynomenidae) (Podotremata: Brachyura). **Journal of Crustacean Biology**, v. 18, n.1, p. 78–94, 1998.

GUINOT, D.; QUENETTE, G. The spermatheca in podotreme crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Podotremata) and its phylogenetic implications. **Zoosystema,** v. 27, n. 2, p. 267-342, 2005.

GUINOT, D.; TAVARES, M. Une nouvelle famille de crabes du Cretacé, et la notion de Podotremata Guinot, 1977 (Crustacea, Decapoda, Brachyura). **Zoosystema**, v. 23, n. 3, p. 507–546, 2001.

GURAYA, S. S. **Biology of spermatogenesis and spermatozoa in mammals**.Springer-Verlag, New York, 1897, 429p.

HARTNOLL, R. G. Mating in the Brachyura. **Crustaceana**. n. l6, p. 161- 181, 1969
.

HARTNOLL, R. G. Morphology of the genital ducts in female crabs. **Journal of the Linnean Society of London, Zoology**, n. 47, p. 279-300, 1968.

HARTNOLL. R. G. Copulatory structure and function in the Dromiacea, and their bearing on the evolution of Brachyura. **Pubblicazione de la Stazione Zoologica di Napoli**, v. 39, p. 657–676, 1975.

HATTORI, G. Y.; PINHEIRO, M. A. A. Fertilidade do caranguejo de mangue *Ucides cordatus* (Linnaeus) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae), em Iguape (São Paulo, Brasil). **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 2, p. 309-313, 2003.

HINSCH, G. W. Penetration of the oocyte envelope by spermatozoa in the spider crab. **Journal of Ultrastructure Research,** v. 35, p. 86-97, 1971.

JAMIESON, B. G. M. Ultrastructure and phylogeny of crustacean spermatozoa. **Memoirs of the Queensland Museum**, v. 31, p. 109–142, 1991.

JAMIESON, B. G. M., TUDGE, C. C. Crustacea-Decapoda. In: Jamieson, B.G.M. (Ed.), **Reproductive Biology of Invertebrates**. Part C, v. 9, 200, p. 01–94.

JAMIESON, B.G.M.; GUINOT, D.; RICHER DE FORGES, B. Phylogeny of the Brachyura (Crustacea: Decapoda): evidence from spermatozoal structure**. Mémoires du Muséum national d'Histoire naturelle, Paris**, v. 166, p. 265–283, 1995.

.

JENSEN, P. C.; ORENSANZ, J. M.; ARMSTRONG, D. A. Structures of the female reproductive tract in the Dungeness Crab (*Cancer magister*) and implications for the mating system. **Biological Bulletin,** v. 190, n. 3, p. 336-349, 1996.

JEYALECTUMIE, C.; SUBRAMONIAM, T. Biochemical composition of seminal secretions with special reference to LDH activity in the reproductive tissues of the field crab, *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). **Experimental Biology**, v. 46, p. 231-236, 1987.

JOHNSON, P. T. **Histology of the blue crab *Callinectes sapidus*: A model for the Decapoda.** Praeger, New York, New York, 1980, 440 p.

JOHNSON, B.; TALBOT, P. Ultrastructural analysis of the pleopod tegumental glands in male and female lobster, *Homarus americanus.* **Journal of Crustacean Biology**. V. 7, p. 288-301, 1987.

JUNQUEIRA, L. C.; JUNQUEIRA, L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia.** Livraria e Editora Santos, São Paulo, 1983, 123p.

KAESTNER, A. **Class Crustacea: Reproduction, Development, and Relationships.** In: Invertebrate Zoology, 1970, p. 35-76.

KITTREDGE, J. S.; TERRY, M.; TAKAHASHI, F. T. Sex pheromone activity of the molting hormone, crustecdysone, on male crabs (*Pachygrapsus crassipes, Cancer antennarius,* and *C. anthonyi*). **Fishery Bulletin**, v. 69, p.337-343, 1971.

KROL, R. M.; HAWKINS, W .E.; OVERSTREET, R. M. Reproductive Componentes. In: HARRISON, F. W., HUMES, A. G. **Microscopic Anatomy of invertebrates**, v, 10: Decapod Crustacea. Wiley-Liss, Inc, 1992, p. 259-343.

LANTEIGNE, C.; BENINGER, P. G.; GIONET. C. Ontogeny of female primary sexual characters in the majid crabs *Chionoecetes opilio* and *Hyas coarctatus*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 16, n. 3, p. 501-514, 1996.

LAUTENSCHLAGER A, BRANDIS D, STORCH V. Morphology and function of the reproductive system of representatives of the genus *Uca*. **Journal of Morphology**. v. 271, p. 1281–1299, 2010.

LEE, T., YAMAZAKI, F. Structure and function of a special tissue in the female genital ducts of the Chinese Freshwater crab *Eriocheir sinensis.* **Biological Bulletin**, v. 178, p. 94-100, 1990.

LEITE, M. M. L. 2005. **Relações morfométricas para a compreensão de aspectos reprodutivos do caranguejo – Uçá *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763), no estuário do rio**

Coreaú-Ceará. Fortaleza-CE. Dissertação de Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais. Universidade Federal do Ceará.

LINHARES, J. C. S. **Estratégias reprodutivas do caranguejo *Ucides cordatus* (Crustacea; Brachyura; Ucididae).** 2010. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil, 2010.

LIRA, J. P. R. de. **História de vida do caranguejo *Goniopsis cruentata* (Latreille, 1803) em um manguezal do nordeste brasileiro.** 2012. Dissertação (mestrado em Programa de Ecologia e Recursos Naturais) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2012.

LÓPEZ GRECO, L. S.; LÓPEZ, G. C; RODRÍGUEZ, E. M. Morphology of spermathecae in the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* Dana 1851 (Grapsidae, Sesarminae). **Journal of Zoology**, v. 249, p. 490–493, 1999.

LÓPEZ-GRECO, L. S.; FRANSOZO, V.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L.; SANTOS, D. C. Comparative morphology of the seminal receptacles of *Ocypode quadrata* (Fabricius, 1787) (Brachyura, Ocypodoidea). **Zootaxa**, v. 2106, p. 41-50, 2009.

MARTIN, J. W. **Crabs of the family Homolodromiidae, III. First record of the larvae. Journal** of Crustacean Biology, v. 11, n. 1, p. 156–161, 1991.

MARTIN, G. G.; HOSE, J. E. Vascular elemets and blood (hemolymph). In HARRISON, F. W., HUMES, A. G. (Eds). **Microscopic anatomy of invertebrates,** v. 10, Crustacea, Decapoda, Wiley-Liss, New York. p. 117-146, 1992.

MARTIN, J. W.; ABELE, L. Notes on male pleopod morphology in the Brachyuran crab Family Panopeidae Ortmann, 1893, Sensu Guinot (1978) (Decapoda). **Crustaceana**, v. 50, n. 2, p 182-198, 1986.

MASON, J. C. 1970. Egg-laying in the western North American crayfish, *Pacifastacus trowbridgii* (Stimpson) (Decapoda, Astacidae). **Crustaceana**, v. 19, p. 37-44, 1970.

MCLAUGHLIN, P. A. **Comparative morphology of recent Crustacea**. San Francisco: W H. Freeman, 1980, 177p.

MCLAY, C. L.; LÓPEZ GRECO, L. S. A. hypothesis about the origin of sperm storage in the Eubrachyura, the effects of seminal receptacle structure on mating strategies and the evolution of crab diversity: How did a race to be first become a race to be last? **Zoologischer Anzeiger,** v. 250, p. 378–406, 2011.

MCLAY, C. L;, LIM, S. S. L.; NG, P. K. L. On the first zoea of *Lauridromia indica* (Gray, 1831), with an appraisal of the generic classification of the Dromiidae (Decapoda: Brachyura) using larval characters. **Journal of Crustacean Biology**, v. 21, n. 3, p. 733–747, 2001.

MEDINA, A. Structural modifications of sperm from the filddler crab *Uca tangeri* (Decapoda) during early stages of fertilization. **Journal of crustacean Biology**, v. 12, n. 4, p. 610-614, 1992.

MELLÓN, D. Connective tissue and supporting structures. In: TAYLOR; TAYLOR (Eds.).

Microscopic Anatomy of Invertebrates: Decapod, Crustacea, New York: Wiley-Liss, v. 10. 1992, p. 77-116.

MELO, G.A.S. **Manual de identificação dos Brachyura (Caranguejos e Siris) do Litoral Brasileiro**. Ed. Plêiade, São Paulo, 1996, 603p.

MOYANO M. P. S.; GAVIO M. A.; CUARTAS E. I. Morphology and function of the reproductive tract of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea, Brachyura, Majoidea): pattern of sperm storage. **Helgoland Marine Research**, v. 64, p. 213–221, 2010.

MOYANO, M. P. S.; GAVIO, M. A.; CUARTAS, E. I. Copulatory system of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea: Brachyura: Majoidea). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdon.** v. 91, n. 8, p. 1617-1625, 2011.

NASCIMENTO, H. L. de. **Biologia reprodutiva do caranguejo *Uca maracoani* (Latreille, 1802) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae) no estuário do Rio Jaguaribe, Aracati - Ceará**. 2011. Monografia (Bacharelado em Ciências Biologicas) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2011.

NG, P. K. L.; GUINOT, D.; DAVIE, P. J. F. Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. **The Raffles Bulletin of Zoology**. Supplement 17, p. 1-286, 2008.

OH, S. J.; HANKIN, D. G. The sperm plug is a reliable indicator of mating success in female Dungeness crabs, *Cancer Magister*. **Journal of Crustacean Biology,** v. 24, p. 314-326, 2004.

PARKER, G. A. Sperm composition and its evolutionary consequences in the insects. **Biological Review**, v. 45, p. 525-567, 1970.

PEARSE, A. G. E. **Histochemistry Theoretical and Applied,** v, 2. Jet. Churchill Ltda, London, 1960. p. 965.

PHILLIPS, B. F., MACMILLAN, D. L. Antennal receptors in puerulus and postpuerulus stages of the rock lobster *Panulirus cygnus* (Decapoda: Palinuridae) and their potential role in puerulus navigation. **Journal of Crustacean Biology**, v. 7, p. 122-135, 1987.

PINHEIRO. M.; HATTORI, G. Embryology of the mangrove crab *Ucides cordatus* (Brachyura: Ocypodidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 23, p. 729-737, 2003.

POHLE G, TELFORD M. Morphology and classification of decapod crustacean larval setae: a scanning electron microscopy study of *Disodactylus crinitichelis* Moreira, 1901 (Brachyura: Pinnotheridae**). Bulletin of Marine Science,** v. 31, p. 736–752, 1981.

RICE, A.L. Crab zoeal morphology and its bearing on the classi- fication of the Brachyura. **Transactions of the Zoological Society of London**, v. 35, n. 3, p. 271–424, 1980.

ROSS, M. H.; REITH, E. J.; ROWRELL, L. J. **Histologia: texto e atlas.** 2ª ed. São Paulo: Panamericana. 1993. 766p.

RYAN, E. P. 1967**. Structure and function of the reprductive system of the crab *Portunus sanguinolentus* (Herbst) (Brachyura: Portunidae).** II. The Female system. Proc. Symp. Crustacea Mar. Biol. Asso, India., p. 522-544.

RYAN, E. P. 1966. Pheromone: evidence in a decapod crustacean. **Science**, v. 151, p. 340-341.

SAINT LAURENT, M. de, Sur la classification et la phylogénie des Crustacés Décapodes brachyoures. II. Heterotremata et Thoracotremata Guinot, 1977. **Comptes rendus hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 290, p. 1317–1320, 1980.

SAINTE-MARIE, B. Sperm demand and allocation in decapod crustaceans. In: Duffy, J.E., Thiel, M. (Eds.), **Evolutionary Ecology of Social and Sexual Systems.** Oxford University Press, New York, 2007, pp. 191–210.

SAINTE-MARIE, G.; SAINTE-MARIE, B. Morphology of the spermatheca, oviduct, intermediate chamber, and vagina of the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). **Canadian Journal of Zoology**, v. 76, p. 1589-1604, 1998.

SAKER, M. M.; ISLAN, M. S.; UEHARA, T. Artificial insemination and early embryonic development of the mangrove crab *Perisesarma bidens (*De Haan) (Crustacea: Brachyura). **Zoological Studies,** v. 48, n. 5, p.607-618, 2009.

SANT'ANNA, B. S.; PINHEIRO, M. A. A.; MATAQUEIRO, M.; ZARA, F. J. Spermathecae of the mangrove crab *Ucides cordatus*: a histological and histochemical view. ***Journal* of the Marine Biological Association of the United Kingdom.** v. 87, p. 903–911, 2007.

SANTHAMMA, K. R.; ADIYODI, R. G. Ovarian growth-related in the spermatheca of the crab *Gecarcinus steniops.* **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 55, n. 4, p 253-260, 1989.

SCHOLTZ, G., RITCHTER, S. Phylogenetic sistematics of the reptantian Decapoda (Crustacea: Malacostraca**). Zoological Journal of Linnean Society**. v. 113, p. 289-328, 1995.

SCHRAM, F., MAPES, R.H. *Imocaris tuberculata*, n. gen., n. sp. (Crustacea: Decapoda) from the Upper Mississippian Imo Formation, Arkansas. **Transactions of the San Diego Society of Natural History,** v. 20, p. 165–168, 1984.

SEIFERT, P. Studies on the sex pheromone of the shore crab, *Carcinus maenas*, with special regard to ecdysone excretion. **Ophelia,** v. 21, p. 147-158, 1982.

SHINOZAKI-MENDES, R. A.; SILVA, J. R. F.; HAZIN, F. H. V. Development of male reproductive system of the blue land crab *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1828 (Decapoda: Gecarcinidae). **Acta Zoologica (Stockholm),** v. 93, p. 390-399, 2012.

SILVA, J. R. F. **Estudo morfológico em ovários de lagostas do gênero *Panulirus* WHITE 1847, (Decapoda, Palinuridae).** 1999. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 1999. 187p.

SMITH, R.L. 1984. **Sperm competition and the evolution of animal mating system.** Academic Press, San Diego, Calif, 1984.

SOUZA, L. P., SILVA, J. R. F. Morphology of the female repro- ductive system of the red-clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata* Latreille, 1803). **Scientia Marina**, v. 73, p. 527–539, 2009.

SOUZA, L. P.; SILVA, J. R. F.; ARAUJO, A. M. A., CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphology of the female genital ducts of the blue land crab *Cardisoma guanhumi* (Crustacea: Brachyura: Gecarcinidae). **Acta Zoologica (Stockholm)**, v. 94, p. 300-307, 2013.

SPALDING, J. F. The nature and formation of the spermatophore and spem plug in *Carcinus maenas*. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 83, p. 389-423, 1942.

SPEARS, T.; ABELE, L. G.; KIM, W. The monophyly of brachyu- ran crabs: a phylogenetic study based on 18S rRNA. **Systematic Biology**, v. 41, n. 4, p. 446–461, 1992.

STEPHENSEN, K. The Branchyura of the Iranian Gulf. Appendix: the male pleopoda of the Brachyura. In: **Danish scientic investigations in Iran**, Part IV. Ejnar Munksgaard, Copenhagen, 1946, p. 57-237.

STERNBERG, R. V., CUMBERLIDGE, N. On the heterotreme-thoracotreme distinction in the Eubrachyura de Saint Laurent, 1980 (Decapoda, Brachyura). **Crustaceana**, v. 74, n.4, p. 321-338, 2001.

STEVCIC, Z. The Main Features of Brachyuran Evolution. **Systematic Zoology**., v. 20, p. 331-340, 1971.

TAVARES, C.; MARTIN, J. W. Suborder Dendrobranchiata Bate, 1888. In: SCHRAM FR, VON VAUPEL KLEIN JC, FOREST J, CHARMANTIER-DAURES M, editors. **Eucarida: Euphausiacea, Amphionidacea, and Decapoda (partim). Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology – The Crustacea.** Leiden: Brill Publishers, 2010, pp. 99–164.

TAYLOR, D. M.; HOOPER, R. G.; ENNIS, G. P. Biological aspects of the spring breeding migration of snow crabs, *Chionoecetes opilio*, in Bonne Bay, Newfoundland (Canada). **Fishery Bulletin**, v. 83, p. 707-710, 1985.

THOMAS, W. J. The setae of *Austropotamobius pallipes* (Crustacea: Astacidae). J. Zool. v. 160, p. 91-142. ADIYODI, K. G., ANILKUMAR. G., 1988. Arthropoda-Crustacea. In**: Reproductive biology of invertebrates, v.3 Accessory Sex Glands**. ADIYODI K. G., ADIYODI, R. G. Eds. Wiley, New York, 1970.

TSUCHIDA, S. FUJIKURA, K. Heterochely, relative growth, and goopod morphology in the bythograeid, *Austinograea williamsi* (Decapoda, Brachyura). **Journal of crustacean biology,** v. 20, n. 2, p. 407-414, 2000.

TÜRKAY, M. O. 1983. **Morphologisch-taxonomische Monographie der Gecarcinidae. Ein Beitrag zur vergleichenden Morphologie der Brachyura (Crustacea: Decapoda)**. – Inaugural- Disertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften vorgelegt

beim Fachbereich Biologie der Johann Wolfgang Goethe Universität zu Frankfurt am Main. p. 1–111.

VITTORI, M., ZNIDARSIC, N., KOSTANJSEK, R. STRUS, J. Microscopic anatomy of male tegumental glands and associated cuticular structuresin *Titanethes albus* (Crustacea: Isopoda). **Arthropod Structure & Develpment**, v. 41, p. 133-144, 2012.

WARNER, G. F. **The biology of crabs.** New York, Elek Science London, 1977, 202 p.

WATLING, L. A classification system for crustacean setae based on the homology concept. In: FELGENHAUER B, WATLING LL, THISTLE A, eds. **Crustacean Issues** 6. , A.A. Balkema, Rotterdam. 1989, p. 15-26.

WILLIAMSON, D. I. Larval characters and the origin of crabs**. Thalassia Jugoslavica**, v. 10, p. 401–414, 1976.

WOLCOTT, D. L.; HOPKINS, C. W. B.; WOLCOTT, T. G. Early events in seminal fluid and sperm storage in the female blue crab *Callinectes sapidus* rathbun: effects of male mating history, male size and, season. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology,** v. 319, p. 43–55, 2005.

XAVIER FILHO, E. S. **Análise filogenética dos grupos recentes dos caranguejos Anomura e Brachyura (Decapoda: Reptantia), baseada em evidências da morfologia comparada**. 2003. STese (doutorado em Zoologia) - Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil, 2003.

XAVIER FILHO, E. S. **Sistema filogenético dos Repstantia (Decapoda: Malascostraca)**. 1995. João Pessoa, Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade Federal da Paraíba. 1995.

YAMAGUCHI, T. Incubation of eggs and embryonic development of the fiddler crab, *Uca lactea* (Decapoda, Brachyura, Ocypodidae). **Crustaceana,** v. 74, p. 449-458, 2001.