

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

Instituto de Biociências – Campus de Botucatu

Pós-graduação em Ciências Biológicas - Zoologia

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO SISTEMA REPRODUTOR DE
MACHOS DE CARANGUEJOS DE ÁGUA DOCE DA FAMÍLIA
PSEUDOTHELPHUSIDAE (MALACOSTRACA: DECAPODA: BRACHYURA)**

FRANCINILDA DE ARAUJO PEREIRA

Orientador: Prof. Dr. William R. A. Santana

Coorientador: Prof. Dr. Fernando José Zara

Botucatu

2025

FRANCINILDA DE ARAUJO PEREIRA

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DO SISTEMA REPRODUTOR DE
MACHOS DE CARANGUEJOS DE ÁGUA DOCE PSEUDOTHELPHUSIDAE
(MALACOSTRACA: DECAPODA: BRACHYURA)**

Tese apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Botucatu, como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Zoologia. Sob a orientação do Prof. Dr. William R. A. Santana. Coorientação do Prof. Dr. Fernando José Zara.

Botucatu

2025

P436c Pereira, Francinilda de Araujo
Caracterização morfológica do sistema reprodutor de machos de caranguejos de água doce da família Pseudothelphusidae (Malacostraca: Decapoda: Brachyura) / Francinilda de Araujo Pereira. -- Botucatu, 2025
99 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: William Ricardo Amâncio Santana
Coorientador: Fernando José Zara

1. Zoologia. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Caracterização morfológica do sistema reprodutor de machos de caranguejos de água doce da família Pseudothelphusidae (Malacostraca: Decapoda: Brachyura)

AUTORA: FRANCINILDA DE ARAUJO PEREIRA

ORIENTADOR: WILLIAM RICARDO AMÂNCIO SANTANA

COORIENTADOR: FERNANDO JOSÉ ZARA

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

Prof. Dr. WILLIAM RICARDO AMÂNCIO SANTANA (Participação Virtual)
Museu de Paleontologia Plácido Cidade Nuvens / Universidade Regional do Cariri - URCA

Profa. Dra. DANIELA CARVALHO DOS SANTOS (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Profa. Dra. JÉSSICA COLAVITE (Participação Virtual)
Museu de Zoologia / Universidade de São Paulo - USP

Prof. Dr. DANIEL JOSÉ MARCONDES LIMA (Participação Virtual)
Museu de Paleontologia Plácido Cidade Nuvens / Universidade Regional do Cariri - URCA

Prof. Dr. ALLYSSON PONTES PINHEIRO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Universidade Regional do Cariri

Botucatu, 29 de novembro de 2024

FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Ao meu filho, Paulo Rafael Araujo Dias.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor William Santana, pela disponibilidade em me orientar na construção desta tese.

Ao Professor Doutor Fernando José Zara, pelo apoio, incentivo, dedicação e empenho na construção deste trabalho.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Ceará - Campus Crato, pelo incentivo e apoio. Às minhas amigas Gabriela Liberalino, Angelica Luna e Cristiane Lima, por me apoiarem de forma incondicional desde sempre.

Ao Laboratório de Crustáceos do Semiárido Nordestino da Universidade Regional do Cariri - Urca – Crato, na pessoa do Professor Doutor Allysson Pinheiro e dos meus companheiros de coleta, Carlito, Paulo Henrique e Carlos.

Ao Laboratório de Sistemática Zoológica LSZ da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Campus de Botucatu, representado aqui por Jéssica Colavite, que foi generosa, companheira e cumpriu na íntegra o seu papel de amiga e pesquisadora. Em nome dela, agradeço a todos os pesquisadores.

Ao Laboratório de Morfologia de Invertebrados IML – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Jaboticabal, em nome da Márcia, que tanto me ajudou e ensinou durante esses anos, e de todos os companheiros: Maria Alice, Lucas e Bárbara, por terem me acolhido tão bem, pelo apoio e ajuda.

À minha irmã, Francilda Araujo, à minha mãe, Hilda Araujo, à minha tia Irene e à família, por tudo. A toda a minha família, que esteve comigo desde sempre e segurou minha mão desde que abracei este projeto.

À Talita Régia e ao Ivan Junior, por terem partilhado comigo essa jornada com tanto amor e cuidado.

A quem me acolheu em Botucatu, esta tese tem um pouco de cada um de vocês. Destaco o Professor Doutor Raoul Henri e a Professora Daniela Carvalho, quem admiro em todas as dimensões, humana e acadêmica.

Aos meus amigos de Botucatu, representados por Joana Darc Gifone, Maria Luiza Figueiredo, Mari, Wanderson, Diones, Sidinara Caye, Silvia Cercal, Lurdinha Lossi e José Alberto Corulli.

À Maria do Carmo e à sua família, por me acolherem tão bem em Jaboticabal, expressarem cuidado e torcerem por mim em todos os momentos.

A Deus, simplesmente, por tudo e sempre, por manter acesa a minha fé nos momentos mais difíceis. Ele foi o socorro presente. A todos os outros que participaram direta ou indiretamente deste trabalho e que, porventura, não foram listados. Muito obrigada! Eu não teria chegado até aqui sem vocês.

RESUMO

O presente trabalho descreve o sistema reprodutor masculino (SRM) das espécies *Fredius ibiapaba*, *Kingsleya attenboroughi* e *Rodriguezus garmani*, com foco na anatomia, histologia e ultraestrutura das vias de secreção. Além disso, foram analisadas a ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides dessas três espécies, incluindo também *Kingsleya sp. nov.* e *Melothelphusa apiaka*, com o objetivo de identificar um padrão para a família desses animais, que são raros na natureza. Os pseudotelfusídeos analisados apresentam o padrão típico de Brachyura, com um órgão bilateral em formato de “H”, formado por um par de testículos conectados a um par de vasos deferentes (VD). Estes são extremamente delgados e pouco volumosos, divididos arbitrariamente em três regiões: anterior (AVD), mais convoluta; média (MVD); e posterior (PVD), ligeiramente mais volumosa e menos convoluta. Não foram observadas glândulas acessórias ou cecos em qualquer região dos VD dessas espécies. Os testículos dos pseudotelfusídeos são do tipo tubular modificado, apresentando características mistas de testículos tubulares e lobulares. Os VD são tubos simples e contínuos, com epitélio colunar, e não apresentam diferenças histológicas e histoquímicas entre suas três regiões. O fluido seminal desses caranguejos é composto por duas secreções glicoproteicas: a secreção do tipo 1, na qual os espermatozoides estão imersos, e a secreção globular do tipo 2, menos abundante na AVD. Essa secreção granular é característica da família e ocorre em todos os gêneros estudados. A ultraestrutura das células dos VD é tipicamente secretora do tipo merócrino, rica em retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi, responsáveis pela produção de glicoproteínas. Essas glicoproteínas são armazenadas em pequenas vesículas de secreção eletrolúcida e eletrodensa, sendo liberadas por exocitose. O pequeno número de vesículas encontradas ao longo do polo apical da célula sugere que a exocitose desde o complexo de Golgi ocorre de maneira rápida e contínua. O fluido seminal é simples e granular, e não há glândulas acessórias em nenhuma região dos VD. Todas as espécies estudadas

apresentaram espermatóforos predominantemente cleitospérmicos. Os espermatozoides das cinco espécies compartilham um padrão comum em Brachyura, caracterizado por um opérculo imperfurado, uma região subopercular menos eletrodensa abaixo do opérculo e a ausência de botão apical. A vesícula acrossomal é esférica ou elíptica, com zonas acrossomais concêntricas e parcialmente envolvida pelo núcleo, além de braços radiais. Essa vesícula é composta por quatro zonas: interna, zona acrossomal raiada, externa e periférica. As análises ultraestruturais apresentadas neste estudo poderão ampliar a compreensão e preencher lacunas nas relações de parentesco entre as famílias de caranguejos de água doce, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre sua biologia reprodutiva. Os resultados indicam que os pseudotelfusídeos possuem características bastante distintas em comparação com os caranguejos de água doce do Novo Mundo pertencentes à família Trichodactylidae. Além disso, este estudo tem potencial para servir como base para futuras pesquisas e para a implementação de medidas de conservação e proteção das localidades-tipo de ocorrência dessas espécies.

Palavras-chave: conservação, morfologia, espermatozoide, espermatóforo, reprodução, Pseudothelphusidae

ABSTRACT

The present study describes the male reproductive system (MRS) of the species *Fredius ibiapaba*, *Kingsleya attenboroughi*, and *Rodriguezus garmani*, focusing on the anatomy, histology, and ultrastructure of the secretory pathways. Additionally, the ultrastructure of the spermatophores and spermatozoa of these three species was analyzed, also including *Kingsleya* sp. nov. and *Melothelphusa apiaka*, aiming to identify a pattern for the family of these animals, which are rare in nature. The pseudotelfusids analyzed exhibit the typical Brachyura pattern, with a bilateral H-shaped organ formed by a pair of testes connected to a pair of vas deferens (VD). They are extremely thin and small in volume, arbitrarily divided into three regions: anterior (AVD), more complicated; medium (MVD); and posterior (PVD), slightly more voluminous and less complicated. No accessory glands or caeca were observed in any VD region of these species. The testes of pseudothelphusids are of the modified tubular type, exhibiting mixed characteristics of tubular and lobular testes. The VD are simple and continuous tubes with columnar epithelium, showing no histological or histochemical differences among their three regions. The seminal fluid of these crabs is composed of two glycoprotein secretions: type 1 secretion, in which the spermatozoa are immersed, and the globular type 2 secretion, less abundant in the AVD. This granular secretion is characteristic of the family and occurs in all studied genera. The ultrastructure of VD cells is typically merocrine-secretory, rich in rough endoplasmic reticulum and Golgi complex, responsible for glycoprotein production. These glycoproteins are stored in small electrolucent and electron-dense secretion vesicles and are released by exocytosis. The small number of vesicles found along the apical pole of the cell suggests that exocytosis from the Golgi complex occurs rapidly and continuously. The seminal fluid is simple and granular, and there are no accessory glands in any VD region. All studied species exhibited predominantly cleistospermatic spermatophores. The spermatozoa of the five species share a common pattern in Brachyura,

characterized by an imperforate operculum, a subopercular region less electron-dense below the operculum, and the absence of an apical button. The acrosomal vesicle is spherical or elliptical, with concentric acrosomal zones and partially enveloped by the nucleus, in addition to radial arms. This vesicle is composed of four zones: internal, radial acrosomal zone, external, and peripheral. The ultrastructural analyses presented in this study may enhance the understanding and fill gaps in the phylogenetic relationships among freshwater crab families, contributing to advances in knowledge about their reproductive biology. The results indicate that pseudothelphusids possess quite distinct characteristics compared to freshwater crabs of the New World belonging to the family Trichodactylidae. Furthermore, this study has the potential to serve as a foundation for future research and for the implementation of conservation and protection measures for the type localities where these species occur.

Keywords: conservation, morphology, spermatozoa, histology, spermatophore, reproduction, Pseudothelphusidae

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização das áreas de coleta de <i>Fredius ibiapaba</i> (Santos et al., 2020), <i>Kingsleya attenboroughi</i> (Pinheiro & Santana, 2016) e <i>Rodriguezus garmani</i> (Rathbun, 1898).....	29
Figura 2 - Desenho esquemático do Sistema Reprodutor Masculino de <i>F. ibiapaba</i> e <i>K. attenboroughi</i>	32
Figura 3 - Anatomia do sistema reprodutor masculino (SRM) dos pseudotelfusídeos <i>F. ibiapaba</i> e <i>K. attenboroughi</i>	34
Figura 4 – Padrão geral da histologia dos testículos, espermatogênese e espermiogênese <i>Fredius ibiapaba</i> , <i>K.attenboroughi</i> e <i>Rodriguezus garmani</i>	37
Figura 5 – Variação do diâmetro nuclear das células germinativas.....	38
Figura 6 - Histologia do sistema reprodutor masculino de <i>Fredius biapaba</i> , <i>Kingsleya attenboroughi</i> e <i>Rodriguezus garmani</i>	40
Figura 7 – Histoquímica da PVD em pseudotelfusídeos.....	42
Figura 8– Ultraestrutura da PVD em pseudotelfusídeos <i>Kingsleya attenboroughi</i>	44
Figura 9 – Ultraestrutura das secreções seminais em pseudotelfusídeos.....	46
Figura 10 – Localização das áreas de coleta de <i>Fredius ibiapaba</i> , <i>Kingsleya attenboroughi</i> , <i>Rodriguezus garmani</i> , <i>Kingsleya</i> sp. nov. e <i>Melothelphusa apiaka</i> (Pedraza et al., 2016).....	61
Figura 11 – Ultraestrutura dos espermatóforos e dos espermatozoides de <i>Fredius ibiapaba</i>	65
Figura 12 – Ultraestrutura dos espermatóforos e dos espermatozoides de <i>Kingsleya attenboroughi</i>	67
Figura 13 – Ultraestrutura dos espermatóforos e dos espermatozoides de <i>Rodriguezus garmani</i>	69
Figura 14 – Ultraestrutura dos espermatóforos e dos espermatozoides de <i>Kingsleya</i> sp. nov.....	71
Figura 15 – Ultraestrutura dos espermatóforos e dos espermatozoides de <i>Melothelphusa apiaka</i>	73
Figura 16 – Características ultraestruturais de espermatóforos e espermatozoides observadas em <i>Fredius ibiapaba</i> , <i>Kingsleya attenboroughi</i> , <i>Rodriguezus garmani</i> , <i>Kingsleya</i> sp. nov. e <i>Melothelphusa apiaka</i>	75

SUMÁRIO

CONSIDERAÇÕES INICIAIS	13
Objetivos gerais e organização do estudo	18
CAPÍTULO 1	19
Morfologia do aparelho reprodutor de machos e vias secretores do fluido seminal de três espécies de caranguejos de água doce Pseudothelphusidae	19
(Malacostraca: Decapoda: Brachyura).....	19
Resumo.....	20
Abstract	22
1 INTRODUÇÃO.....	24
2 MATERIAL E MÉTODOS	28
2.1 Animais	28
2.2 Detalhes da área e atividade de amostragem.....	29
2.3 Análises histológicas e histoquímicas e microscopia eletrônica de transmissão	30
2.4 Ultraestrutura da secreção e vias de secreção	31
3 RESULTADOS	32
3.1 Histologia e histoquímica dos vasos deferentes	39
3.2 Ultraestrutura do vaso deferente e do fluido seminal.....	43
3.3 Discussão.....	47
3.4 Conclusão	53
CAPÍTULO 2	54
Ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozóides de espécies da família Pseudothelphusidae (Malacostraca: Decapoda: Brachyura).....	54
Resumo.....	55
Abstract	56
1 INTRODUÇÃO.....	57
2 MATERIAIS E MÉTODOS	60
2.1 Animais	60
2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	61
3 RESULTADOS	63
3.1 Morfologia geral dos espermatóforos e dos espermatozoides	63
3.2 Discussão.....	76
3.3 Conclusão	79
CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
REFERÊNCIAS.....	83

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Os caranguejos verdadeiros pertencem à infraordem Brachyura, que é uma das mais diversas dentro dos decápodes, com mais de 7.683 espécies descritas em 107 famílias (De Grave et al., 2023). Dentre essas famílias, cinco são exclusivamente associadas a ambientes de água doce: Gecarcinucidae (MacLay, 1838), Potamonautidae (Bott, 1970), Potamidae (Ortmann, 1896), Pseudothelphusidae (Ortmann, 1893) e Trichodactylidae (H. Milne Edwards, 1853). Essas famílias estão distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais da América Central e do Sul, da África, do sul da Europa, da Índia, da Ásia e da Austrália (Cumberlidge et al., 2009).

Vale destacar, nesse contexto, que a superfamília Pseudothelphusoidea passou por uma reestruturação taxonômica proposta por Álvarez et al. (2020). Essa reclassificação é semelhante às classificações baseadas em tribos propostas por Rodríguez (1982), mas apresenta um sistema taxonômico atualizado. Como resultado, foram estabelecidas duas famílias distintas: Epiloboceridae, que inclui o gênero *Epilobocera* Stimpson, 1860, e Pseudothelphusidae, que engloba os demais gêneros conhecidos. Sendo assim, atualmente, a família Pseudothelphusidae é subdividida em oito subfamílias: Guinotiinae, Hypolobocerinae, Kingsleyinae, Potamocarcininae, Pseudothelphusinae, Ptychophallinae, Raddausinae e Strengerianae. A faixa de distribuição de cada subfamília corresponde a uma área geográfica diferente, onde a subfamília Kingsleyinae é tida como a divisão mais para a porção oriental, por ser exclusiva da América do Sul (Magalhães, 2003a; Pedraza et al., 2016).

Os caranguejos de água doce na Região Neotropical estão distribuídos em duas famílias: Pseudothelphusidae, que ocorrem principalmente em regiões montanhosas da América do Sul e Central e com distribuições altitudinais que podem chegar até 3.000 metros sobre o nível do mar (Rodríguez & Magalhães, 2005); e Trichodactylidae, que, com exceção

de quatro espécies, ocorrem na parte sul do México, com distribuição restrita à América do Sul, nas planícies costeiras das Guianas e do Brasil, nas planícies fluviais do Amazonas, do Orinoco, do Paraguai e do Paraná, e as bacias do Magdalena e do Maracaibo (Rodríguez, 1992). A Região Neotropical abrange todo o continente sul-americano, América Central, México, ilhas do Caribe e sul da Flórida, apresentando um clima que varia desde o tropical, com águas mais quentes, até o subtropical, com águas mais frias, como observado no sul do Brasil, do Uruguai, do Paraguai, da Argentina e do Chile (Cumberlidge et al., 2014). Ambas as famílias são caracterizadas pelo desenvolvimento direto e com um ciclo de vida completamente desvinculado do ambiente marinho (Klaus & Brandis, 2011).

Atualmente, a família Pseudothelphusidae inclui cerca de 49 gêneros e 309 espécies. No Brasil, são conhecidas 21 espécies, distribuídas em 5 gêneros (Álvarez et al., 2020; Santos, 2020). Nos últimos anos, novas espécies têm sido descritas, como *Kingsleya castrensis* (Pedraza et al., 2015), *Kingsleya celioi* (Pedraza et al., 2016), *Kingsleya attenboroughi* (Pinheiro & Santana, 2016), *Kingsleya parnaíba* (Pralon et al., 2020) e *Fredius ibiapaba* (Santos et al., 2020). Essas descobertas refletem o crescente interesse e os avanços nas pesquisas sobre essa família no Brasil, sendo parte de um esforço contínuo para compreender melhor a fauna de caranguejos de água doce no país. Tais descobertas têm ocorrido principalmente em bacias hidrográficas das regiões da Amazônia, do Cerrado e da Caatinga, áreas que apresentam uma grande diversidade de espécies, o que aponta para a importância das pesquisas para a compreensão da biodiversidade e da biologia reprodutiva de caranguejos de água doce no Brasil.

Esses ecossistemas abrigam uma grande biodiversidade de fauna endêmica aquática, terrestre e semiterrestre, e a deterioração desses corpos hídricos, associada ao crescimento da população humana e ao desmatamento, tem um impacto negativo sobre a biodiversidade aquática continental (Dudgeon, 1992; Dudgeon, 2000; Dudgeon et al., 2006; Strayer, 2006),

que alberga diversos organismos invertebrados, como caranguejos de água doce, maxilópodos (copépodes), aracnídeos (ácaros) e insetos (dípteros, tricópteros, coleópteros, etc.), desempenhando a função de manutenção dos níveis tróficos e apresentam uma biodiversidade taxonômica de importância ecossistêmica para esses locais (Albertoni & Silva, 2010). Como afirmam Cumberlidge e Ng (2016), a proporção de caranguejos de água doce ameaçados de extinção é igual à dos corais construtores de recifes e excede a de todos os outros grupos que foram avaliados.

Entretanto, a falta de dados sobre essa família é preocupante, especialmente considerando a degradação desses corpos hídricos, impulsionada pelo crescimento populacional e pelo desmatamento, exercendo um impacto negativo sobre a diversidade aquática continental (Dudgeon, 1992; Dudgeon, 2000; Dudgeon et al., 2006; Strayer, 2006).

Além de ampliar a compreensão sobre a biodiversidade, faz-se necessário conhecer a biologia reprodutiva dessa família, uma vez que a maior parte dos estudos sobre o Sistema Reprodutor Masculino de braquiúros tem como foco representantes marinhos, e.g., Majoidea e Portunoidea (Bauer, 2013; Cobo & Costa, 2012; Cunningham & Williams, 2002; Hartnoll, 2002; Ragionieri & Hernández, 2009). Já os estudos relacionados à caranguejos de água doce comumente enfocam a ultraestrutura do espermatozóide e possíveis relações filogenéticas entre grupos do Velho Mundo, sendo Gecarcinucoidea e Potamoidea bem exploradas (Guinot et al., 1997; Klaus & Brandis, 2011; Klaus et al., 2009; Klaus et al., 2013; Scalici et al., 2010).

No Brasil, os estudos envolvendo caranguejos dulcícolas têm como foco a descrição do SRM, a ultraestrutura do espermatozóide e a biologia reprodutiva de certos representantes de Trichodactylidae (Almeida et al., 2019; De Oliveira & Zara, 2018; De Oliveira et al., 2021; Silva et al., 2012). Até o presente momento, não são conhecidos estudos científicos envolvendo qualquer tipo de análise do SRM, da ultraestrutura do espermatozóide ou dos parâmetros relacionados a tais quesitos reprodutivos em representantes de Pseudothelphusidae.

O sistema reprodutor masculino (SRM) dos representantes da infraordem Brachyura é constituído por um par de testículos dispostos nas margens superiores do cefalotórax, os quais desembocam no vaso deferente (VD), terminando na região posterior do corpo do caranguejo, junto às aberturas dos gonóporos. Comumente, os testículos apresentam anatomia em forma de “H” para a maioria dos braquiúros, podendo ainda ter forma de “V” ou “U invertido” em certos grupos. Conectados aos testículos, os VD apresentam três regiões, as quais são delimitadas por meio da morfologia e do incremento (ou não) do diâmetro do vaso e por sua função na produção de fluido seminal e montagem dos espermatóforos: anterior (AVD), média (MVD) e posterior (PVD) (Antunes et al., 2018; De Oliveira & Zara, 2018; Diesel, 1989; Krol et al., 1992, López-Greco, 2013; Nascimento & Zara, 2013; Tiseo et al., 2014; Watanabe et al., 2020; Zara et al., 2012).

No presente estudo, abordamos quatro gêneros: *Fredius* Pretzmann, 1967, *Kingsleya* Ortmann, 1897; *Rodriguezus* Rathbun, 1898 e *Melothelphusa* Pedraza, Tavares & Magalhães, 2016.

Atualmente, *Fredius* é composto por catorze espécies distribuídas por um vasto território, que abrange cinco bacias hidrográficas principais (Magalhães et al., 2014; Rodríguez & Campos, 1998): (1) Orinoco; (2) Essequibo-Cuyuni; (3) Amazonas; (4) Rio Madeira e seu afluente, Rio Machado; e (5) com drenagem costeira de pequenos rios no norte da América do Sul (Guiana, Suriname e Guiana Francesa), desembocando diretamente no Oceano Atlântico. *Fredius ibiapaba* ocorre em pequenos igarapés da floresta, em terra firme e em áreas sombreadas e úmidas do solo da floresta, próximo de pequenos cursos d'água, evoluindo isolados no topo de um platô úmido, encravados no semiárido nordestino, numa área de proteção ambiental (APP), na Serra de Ibiapaba, município de Ipú, ao norte do estado do Ceará.

Kingsleya é composto, atualmente, por onze espécies com alto grau de endemismo e, dessas espécies conhecidas, dez ocorrem em território brasileiro. As espécies brasileiras

ocorrem na Bacia Amazônica, nos altiplanos do Escudo Central Brasileiro, exceto as duas espécies mais recentemente descritas, *Kingsleya attenboroughi* Pinheiro & Santana, 2016, no sul do Ceará, e *Kingsleya parnaíba* Pralon et al., 2020, no sudoeste do Piauí. Somando-se, as espécies são encontradas nos estados do AM, PA, RR, PI e CE. *Kingsleya attenboroughi* possui habitat em remanescentes de florestas úmidas no bioma Caatinga, uma vegetação desértica exclusiva do nordeste do Brasil, a área mencionada vem sofrendo pressões antropogênicas, principalmente aquelas relacionadas ao desenvolvimento da terra e ao uso de recursos hídricos, onde tais fatores restringem o habitat da nova espécie a pequenas áreas próximas às fontes dos córregos (Pinheiro & Santana 2016).

Rodriguezus é composto por seis espécies e *Rodriguezus garmani* é encontrada predominantemente ao longo dos Andes e da Cordilheira Costeira da Venezuela e nas terras altas da Ilha Margarita, em Trinidad e Tobago. Essa espécie vive em riachos e rios de água doce e em altitudes acima de 50-800 m acima do nível do mar, constrói tocas ou se esconde em fendas naturais perto de riachos de correnteza rápida (Campos & Magalhães, 2004).

Melothelphusa, com oito espécies descritas até o momento, é considerado um dos gêneros mais basais dentro dos Kingsleyini. *Melothelphusa apiaka*, marcando a ocorrência mais ao sul de pseudotelfusídeos na parte oriental da América do Sul, são encontradas principalmente na Amazônia e em áreas adjacentes. As espécies do gênero são conhecidas por suas adaptações a habitats aquáticos, como rios e córregos com águas rápidas e claras (Rodrigues & Melo, 2009).

Uma das espécies ainda não foi formalmente descrita, mas já disponibilizada para nosso trabalho, *Kingsleya* sp. nov.

Considerando todo o cenário apresentado, este trabalho descreve o SRM, a espermatogênese e a produção de fluido seminal de pseudotelfusídeos, por meio de análises macroscópicas, histológicas, histoquímicas e ultraestruturais, observando, pela primeira vez, a

descrição comparativa da ultraestrutura dos espermatozóides e espermatóforos de espécies *Fredius ibiapaba*, *Kingsleya attenboroughi*, *Rodriguezus garmani*, *Kingsleya* sp. nov. e *Melothelphusa apiaka*.

Objetivos gerais e organização do estudo

Este estudo visa descrever detalhadamente a morfologia do aparelho reprodutor de machos de diferentes quatro espécies endêmicas de caranguejos de água doce da Família Pseudothelphusidae.

Esta tese está organizada em dois capítulos: o primeiro trata da descrição detalhada referente à anatomia, histologia e histoquímica do aparelho reprodutor de machos, e a ultraestrutura das secreções e vias de secreção dos vasos deferentes de *Kingsleya attenboroughi*, *Fredius ibiapaba* e *Rodriguezus garmani*.

Já o segundo explora a caracterização ultraestrutural de espermatóforos e espermatozoides de *F. ibiapaba*, *K. attenboroughi*, *R. garmani*, *Kingsleya* sp. nov. e *Melothelphusa apiaka*.

CAPÍTULO 1

Morfologia do aparelho reprodutor de machos e vias secretores do fluido seminal de três espécies de caranguejos de água doce Pseudothelphusidae
(Malacostraca: Decapoda: Brachyura)

Resumo

O sistema reprodutor masculino (SRM) da família Pseudothelphusidae, exclusiva da região Neotropical de caranguejos dulcícolas, é descrito pela primeira vez por meio de três espécies de gêneros diferentes. O SRM de *Fredius ibiapaba*, *Kingsleya attenboroughi* e *Rodriguezus garmani* foi analisado quanto à anatomia, histologias e ultraestrutura buscando um padrão para a família desses animais raros de coleta. O SRM desses pseudotelfusídeos mostra o padrão típico de Brachyura, um órgão bilateral em formato de “H”, o qual é formado por um par de testículos, conectados a um par de vaso deferente (VD), externamente delgados e pouco volumosos, divididos arbitrariamente em três regiões: anterior (AVD), mais convoluta, média (MVD) e posterior (PVD), ligeiramente mais volumosas e menos convolutas, devido à ausência de modificações anatômicas marcadas. Não foi observada a presença de glândulas acessórias, *outpockets* ou cecos em qualquer região dos VD desses animais. Os testículos dos pseudotelfusídeos são do tipo tubular modificado, com características mistas de testículos tubulares e lobulares. Os VD nesses animais são tubos simples e contínuos apresentando epitélio colunar desde o início até o fim dessas estruturas e não mostram diferenças histológicas e histoquímicas nas três regiões. O fluido seminal nos pseudotelfusídeos é composto por duas secreções de caráter glicoproteico: a secreção do tipo 1, em que os espermatozoides estão imersos e entremeados a esses gametas; a secreção globular do tipo 2, sendo menos abundante na AVD. Esta secreção granular é típica para a família, ocorrendo em todos os gêneros estudados. A ultraestrutura das células dos VD é tipicamente secretora com mecanismo merócrino. Elas são ricas em retículo endoplasmático rugoso e grandes complexos de Golgi, sendo responsáveis pela produção de glicoproteínas, armazenadas em pequenas vesículas de secreção eletrolúcida e outras eletrodensas, cuja secreção é liberada por exocitose. Devido ao pequeno número de vesículas encontradas ao longo do polo apical da célula, a exocitose desde

o Golgi parece ser bastante rápida e contínua, o fluido seminal simples e granular, sem glândulas acessórias em qualquer região dos VD, características que podem ser consideradas um estado sinapomórfico, que diverge da família Trichodactylidae e se assemelha às famílias de caranguejos de água doce do Velho Mundo. Por meio deste trabalho, pode-se perceber que esse grupo apresenta características bastante divergentes quando comparado com os outros caranguejos de água doce do Novo Mundo da família Trichodactylidae. Além disso, o presente trabalho tem o potencial de servir como base para futuras pesquisas, para a implementação de medidas de conservação e proteção para as localidades-tipo de ocorrência dessas espécies.

Palavras-chave: conservação, anatomia, histologia, fluido seminal, espermatozoide, reprodução

Abstract

The male reproductive system (MRS) of the Pseudothelphusidae family, exclusive to the Neotropical region of freshwater crabs, is described for the first time through three species from different genera. The MRS of *Fredius ibiapaba*, *Kingsleya attenboroughi*, and *Rodriguezus garmani* was analyzed in terms of anatomy, histology, and ultrastructure, aiming to establish a pattern for the family of these rarely collected animals. The MRS of these pseudothelphusid crabs shows the typical Brachyura pattern, a bilateral "H"-shaped organ consisting of a pair of testes connected to a pair of extremely thin and small vas deferens (VD), arbitrarily divided into three regions: anterior (AVD), more convoluted; middle (MVD); and posterior (PVD), slightly more voluminous and less convoluted, due to the absence of marked anatomical modifications. No accessory glands, outpockets, or ceca were observed in any region of the VD in these animals. The testes of pseudothelphusids are of the modified tubular type, with mixed characteristics of tubular and lobular testes. The VD in these animals are simple, continuous tubes with columnar epithelium throughout, showing no histological or histochemical differences across the three regions. The seminal fluid in pseudothelphusids consists of two glycoprotein-type secretions: type 1 secretion, where sperm cells are immersed and intermixed with the gametes; and type 2 globular secretion, less abundant in the AVD. This granular secretion is typical of the family and occurs in all the studied genera. The ultrastructure of the VD cells is typically secretory with a merocrine mechanism. They are rich in rough endoplasmic reticulum and large Golgi complexes, responsible for producing glycoproteins stored in small electrolucent and other electrodense secretion vesicles, whose secretion is released by exocytosis. Due to the small number of vesicles found along the apical pole of the cell, exocytosis from the Golgi seems to be quite rapid and continuous. The seminal fluid is simple and granular, with no accessory glands in any region of the VD—features that can be

considered synapomorphic, differing from the Trichodactylidae family and resembling freshwater crab families of the Old World. This work shows that this group presents characteristics that are quite divergent when compared to other New World freshwater crabs of the Trichodactylidae family. Additionally, this study has the potential to serve as a basis for future research aimed at implementing conservation and protection measures for the type localities where these species occur.

Keywords: conservation, anatomy, histology, seminal fluid, spermatozoon, reproduction

1 INTRODUÇÃO

Na infraordem Brachyura, o sistema reprodutor masculino (SRM) é constituído por um par de testículos dispostos, posicionando-se nas margens superiores do cefalotórax, os quais desembocam no vaso deferente (VD), terminando na região posterior do corpo do caranguejo, junto às aberturas dos gonóporos. Comumente, os testículos apresentam anatomia em forma de “H”, padrão mais comum para a maioria dos braquiúros, podendo, ainda, em certos grupos, ter forma de “V” ou “U invertido”. Conectados aos testículos, os VD apresentam três regiões, as quais são delimitadas por meio da morfologia e do incremento (ou não) do diâmetro do vaso e por sua função na produção de fluido seminal e montagem dos espermatóforos: anterior (AVD), média (MVD) e posterior (PVD) (Antunes et al., 2018; De Oliveira & Zara, 2018; Diesel, 1989; Krol et al., 1992; López-Greco, 2013; Nascimento & Zara, 2013; Tiseo et al., 2014; Watanabe et al., 2020; Zara et al., 2012).

Os espermatozoides são produzidos nos testículos e encaminhados à AVD, na porção proximal desta região - AVDp, massas de espermatozoides imersas em fluido seminal serão armazenadas, enquanto na porção distal desta região - AVDd, uma secreção distinta envolverá os espermatozoides, formando a parede dos espermatóforos (Klaus et al., 2009). Assim, a função da AVD é formar espermatóforos a partir de secreções liberadas pelo epitélio dos vasos. Tais estruturas carreadoras de espermatozoides podem ser ovais ou arredondadas, são delimitadas por uma parede e podem conter vários espermatozóides (espermatóforo do tipo coenospérmico) ou apenas um espermatozoide (espermatóforo do tipo cleistospérmico). Posteriormente, os espermatóforos serão armazenados na MVD e na PVD, sendo que nesta última região também ocorrerá a produção de fluido seminal. Ainda, em alguns grupos, como Majoidea, Portunoidea e Trichodactyloidea, glândulas acessórias encontradas na MVD e/ou na PVD podem auxiliar na formação de fluido seminal e são responsáveis, principalmente, por

formar pacotes ou plugues espermáticos (Antunes et al., 2018; Castilho et al., 2008; De Oliveira & Zara, 2018; De Oliveira et al., 2021).

Os testículos, segundo a classificação histológica proposta por Nagao e Munehara (2003), podem ser classificados em lobular ou tubular. O tipo lobular exhibe vários lóbulos, cistos ou ácidos seminíferos, que se conectam por um ducto seminífero central, padrão mais comumente encontrado em *Brachyura* (Batoy et al., 1989; Castilho et al., 2008; Diesel, 1989; Erkan et al., 2009; Hinsch & Walker, 1974; Johnson, 1980; Moriyasu & Benhalima, 1998; Nagao & Munehara, 2003; Santos et al., 2009; Simeó et al., 2009). O tipo tubular, por sua vez, é constituído por um túbulo único e convoluto, preenchido por células germinativas em estágios diferentes de maturação, mesmo padrão encontrado em *Maja brachydactyla* Balss, 1922 (Simeó et al., 2009). Geralmente, a região periférica do túbulo seminífero é preenchida por espermatogônias, formando os centros germinativos. Os espermatócitos e as espermátides ocupam amplo espaço da região intermediária dos túbulos seminíferos, formando a zona de maturação (Nagao & Munehara, 2003). A zona de evacuação é constituída por um túbulo coletor que armazena e carrega espermatozoides maduros através dos ductos seminíferos e direcionando os espermatozoides até o vaso deferente (Nagao & Munehara, 2003; Simeó et al., 2009).

Os espermatozoides são imóveis e aflagelados, com acrossoma ou vesícula acrossomal constituída por camadas concêntricas revestidas por uma membrana moderadamente eletrodensa, sendo centralmente penetrado pelo *perforatorium*, ou tubo perfurador (Subramoniam, 1983; Tudge, 2009). A transferência de espermatozoides é realizada pelos gonópodos e pelo pênis, protegidos por um envelope protetor, o espermatóforo, durante a cópula (Krol et al., 1992). O esperma pode ser estocado em uma porção modificada do ducto genital, o *receptáculo seminal*, (Krol et. al., 1992) ou em uma invaginação do exoesqueleto, sem ligação com o ducto genital, a espermateca (Guinot & Quenette, 2005).

Estudos relacionados a caranguejos de água doce, comumente, enfocam a ultraestrutura do espermatozoide e as possíveis relações filogenéticas entre grupos do Velho Mundo, sendo Gecarcinucoidea e Potamoidea bem exploradas (Guinot et al., 1997; Klaus & Brandis, 2011; Klaus et al., 2009; Klaus et al., 2013; Scalici et al., 2010).

Nos últimos anos, novas espécies recém-descritas mostram-se possivelmente ameaçadas de extinção, como é o caso de *Fredius ibiapaba* (Santos et al., 2020) e *Kingsleya attenboroughi* (Pinheiro & Santana, 2016). *F. ibiapaba*, ao que se sabe atualmente, apresenta distribuição muito restrita (cerca de 4 km) em um único fragmento de floresta, no município de Ipú (CE), enquanto *K. attenboroughi* apresenta registros de ocorrência em três áreas disjuntas e antropizadas, em uma faixa remanescente de floresta úmida isolada, em meio a uma densa área de Caatinga (steppe savannah), nos municípios de Barbalha e Missão Velha (CE) (Araújo et al., 2020; Pinheiro & Santana, 2016; Santos et al., 2020, 2023). Embora pseudotelfusídeos não apresentem valor comercial, eles são muito afetados por ações antropogênicas, principalmente a degradação de habitats e as mudanças nas paisagens naturais, ocasionando redução significativa nas populações (Magalhães, 2016).

No Brasil, os estudos envolvendo caranguejos dulcícolas têm como foco a descrição do SRM, a ultraestrutura do espermatozóide e a biologia reprodutiva de alguns representantes da família Trichodactylidae (Almeida et al., 2019; De Oliveira & Zara, 2018; De Oliveira et al., 2021; Silva et al., 2012). Até o presente momento, não são conhecidos estudos científicos envolvendo qualquer tipo de análise do SRM, da ultraestrutura do espermatozóide ou dos parâmetros relacionados a tais quesitos reprodutivos em representantes da família Pseudothelphusidae.

Vale destacar que o estudo da biologia reprodutiva dessas espécies, incluindo anatomia, histologia, histoquímica e ultraestrutura do fluido seminal é fundamental para compreender a taxonomia e as relações de parentesco entre elas (Assugeni et al., 2017; Camargo et al., 2016;

Camargo et al., 2017; Garcia Bento et al., 2018; Jamieson & Tudge, 2000; Tudge, 2009). Pretendemos fornecer subsídios para suportar ou não a hipótese de que ocorreram dois eventos distintos de conquista do ambiente de água doce do Novo Mundo, como proposto por Tsang et al. (2014) e Wolfe et al. (2023) através das ferramentas moleculares, fornecendo uma base sólida para comparar processos de adaptação morfológica e molecular em caranguejos, oferecendo informações sobre as restrições evolutivas e os caminhos de transição que ajudaram esses crustáceos a explorar novos habitats.

Considerando o cenário apresentado, este trabalho descreve o Sistema Reprodutor Masculino, a espermatogênese e a produção de fluido seminal em três pseudotelfusídeos: *Fredius ibiapaba*, *Kingsleya attenboroughi* e *Rodriguezus garmani* (Rathbun, 1898). Por meio de análises macroscópicas, histológicas, histoquímicas e ultraestruturais, pretendemos fornecer subsídios para corroborar ou não a hipótese de que ocorreram dois eventos distintos de conquista do ambiente de água doce do Novo Mundo, como proposto por Tsang et al. (2014) e Wolfe et al. (2023), com a filogenia baseada em dados moleculares, fornecendo uma base sólida para comparar processos de adaptação morfológica e genética em caranguejos, oferecendo informações sobre as restrições evolutivas e os caminhos de transição que ajudaram esses crustáceos a explorar novos habitats.

Se a hipótese de dois eventos ocorreu, esperam-se padrões anatômicos, histológicos e histoquímicos distintos entre essas duas famílias do Novo Mundo e esperamos ter elementos morfológicos para relacionar ou não a família Pseudothelphusidae com os caranguejos de água doce do Velho Mundo. Além disso, o presente trabalho tem o potencial de servir como base para futuras pesquisas e para a implementação de medidas de conservação e proteção para as localidades-tipo de ocorrência dessas espécies.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Três caranguejos machos das espécies *Fredius ibiapaba*, *Kingsleya attenboroughi* e *Rodriguezus garmani* foram coletados manualmente em buracos, em serrapilheira e em solo úmido de florestas de terra firme ou próximos a pequenos riachos. Em novembro de 2015, machos de *R. garmani* foram coletados em Ilha Margarita, Venezuela (11°01'04" N, 63°55'20" W) (Figura 1). Posteriormente, em novembro de 2021, representantes de *K. attenboroughi* e *F. ibiapaba* foram obtidos nos municípios de Barbalha (07°20'07.6" S, 39°23'58.8" W) e Ipu (04°17'42" S, 40°44'43" W), respectivamente, ambos localizados no estado do Ceará, Nordeste do Brasil (Figura 1). Após as coletas, os caranguejos foram devidamente transportados ao laboratório em caixas térmicas com aeração e mantidos por um curto período de tempo (24 horas) em aquários com fundos escuros (45 x 25 x 30 cm), contendo refúgios artificiais e sedimento argilo-siltoso e folhiço como substrato (temperatura $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$).

2.2 Detalhes da área e atividade de amostragem

Distribuição geográfica e locais de coleta dos caranguejos de água doce Psedotherphusidae, *Fredius ibiapaba*, *Kingsleya attenboroughi* e *Rodriguezus garmani* (Figura 1 A). A Figura 1 B indica as espécies coletadas no norte e no sul do Ceará, sendo a 1- *F. ibiapaba* e a 2- *K. attenboroughi*. Já a Figura 1 C indica a espécie 3- *R. garmani* em Ilha Marguerita – Venezuela.

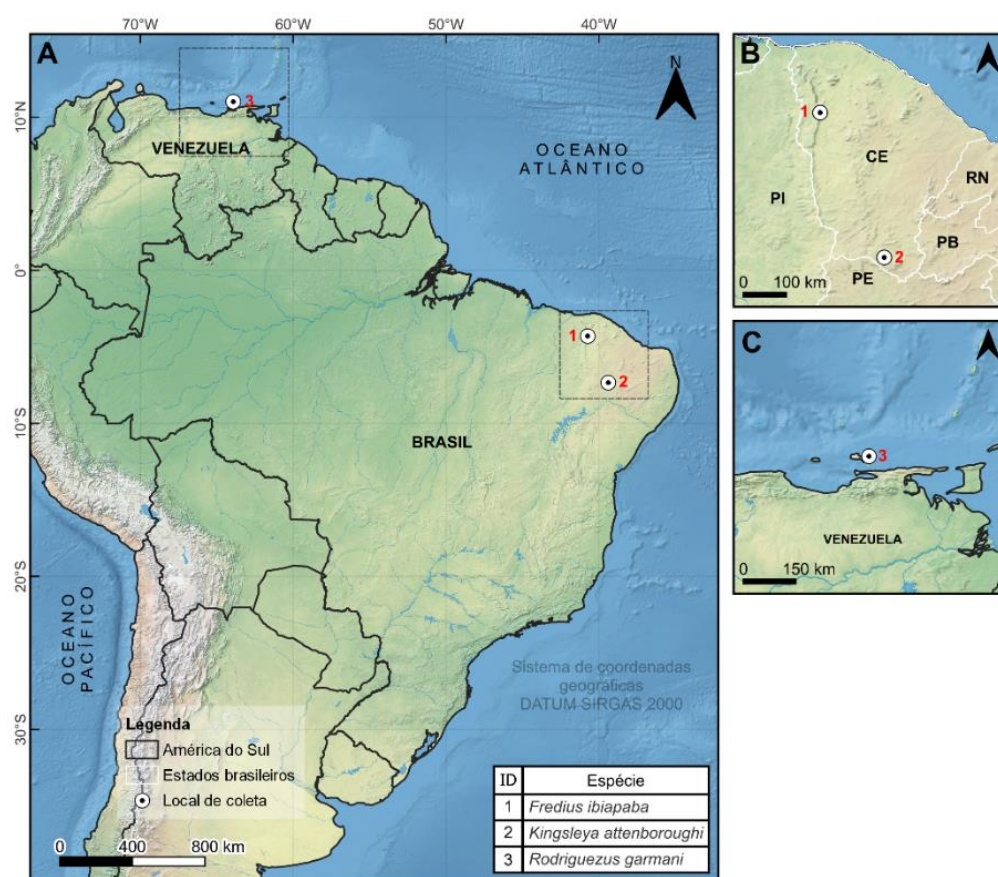


Figura 1. Localização das áreas de coleta de (01) *Fredius ibiapaba* (Santos et al., 2020), (02) *Kingsleya attenboroughi* (Pinheiro & Santana, 2016) e (03) *Rodriguezus garmani* (Rathbun, 1898).

2.3 Análises histológicas e histoquímicas e microscopia eletrônica de transmissão

Em laboratório, espécimes foram anestesiados por resfriamento (-20°C por 10 min), tiveram a largura de carapaça (CW - distância máxima entre as margens anterolaterais) mensurada e, posteriormente, foram dissecados. Para a descrição anatômica do SRM dos pseudotelfusídeos, os testículos e os VD de três indivíduos de cada espécie foram cuidadosamente removidos dos animais e fixados em paraformaldeído 4% por 24 horas. Logo após, os SRM das três espécies foram devidamente fotografados sob o estereomicroscópio (câmera Leica EC4 com software Leica® LAS EZ).

Para as análises histológicas, os testículos foram dissociados dos VD, e estes foram segmentados, de acordo com as diferentes regiões observadas nas análises macroscópicas. Assim, amostras dessas estruturas foram lavadas duas vezes em tampão fosfato 0,2 M (pH 7,4), desidratadas em uma série crescente de etanol (70-95%) e embebidas em historesina glicol-metacrilato Leica®. Seções de 4 a 7 µm de espessura foram obtidas no micrótomo rotativo Leica® RM2245. Após a microtomia, lâminas contendo os cortes foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) para descrever o SRM. Foram utilizadas lâminas coradas com PAS (ácido periódico de Schiff) e contracoradas com hematoxilina (PAS + H) para descrever os testículos e o processo de espermatogênese nas três espécies de pseudotelfusídeos.

Para descrição histoquímica, lâminas do aparelho reprodutor masculino foram coradas com Xylidine ponceau para proteínas (Mello & Vidal, 1980), e a presença de polissacarídeos neutros e ácidos foi verificada com Periodic Acid-Schiff (PAS) e Azul Alcian (pH 2,5), respectivamente (Junqueira & Junqueira, 1983).

Os diâmetros das células germinativas durante a espermatogênese e a espermiogênese foram registrados em lâminas coradas com PAS + H dos testículos de *K. attenboroughi*, sob a magnificação de 100X e mensurados por meio do Software IM50 Leica® (Zara et al., 2012).

Dez células de cada tipo celular foram mensuradas aleatoriamente nas lâminas dos três machos de *K. attenboroughi* aqui analisados (N: 30 para cada estágio germinativo). Diferenças entre os diâmetros das células germinativas ao longo da espermiogênese e espermatogênese (transformados em $\log_{10}$) foram comparadas por meio de uma análise de variância (ANOVA) (W-Statistic, teste de normalidade atendido; $p > 0.05$), seguida do teste de comparação múltipla de Tukey, usado para comparar as médias dos diâmetros entre os diferentes estágios de desenvolvimento (Gotelli & Ellison, 2004). Todos os cálculos e análises estatísticas foram realizados com o software R versão 4.4.1. (R Development Core Team, 2024).

2.4 Ultraestrutura da secreção e vias de secreção

Para a microscopia eletrônica de transmissão (MET), fragmentos de aproximadamente 1 mm³ da PVD de dois representantes de cada uma das três espécies de pseudotelfusídeos aqui analisados foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) por 4 horas. Essas amostras foram lavadas no mesmo tampão (três vezes por 10 min). Pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% durante 2 horas, no mesmo tampão. Após três lavagens, os materiais foram contrastados “En Bloc” com acetato de uranila 1% aquoso (overnight em 4°C). Logo após, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona (70-100%) e, posteriormente, incluídas em resina Epon-Araldite. Os cortes ultrafinos foram obtidos no ultramicrotomo Leica[®] UC7, contrastados com acetato de uranila aquoso 2% e citrato de chumbo 0,4%. Todas as amostras foram analisadas e fotografadas no MET Jeol JEM 1010 operado a 80KV.

3 RESULTADOS

O Sistema Reprodutor Masculino, nas três espécies de Pseudothelphusidae aqui descritas, é bilateral, localizado na região dorsal da cavidade cefalotorácica, imediatamente abaixo do ceco gástrico, como represenando na Figura 2, desenho esquemático.

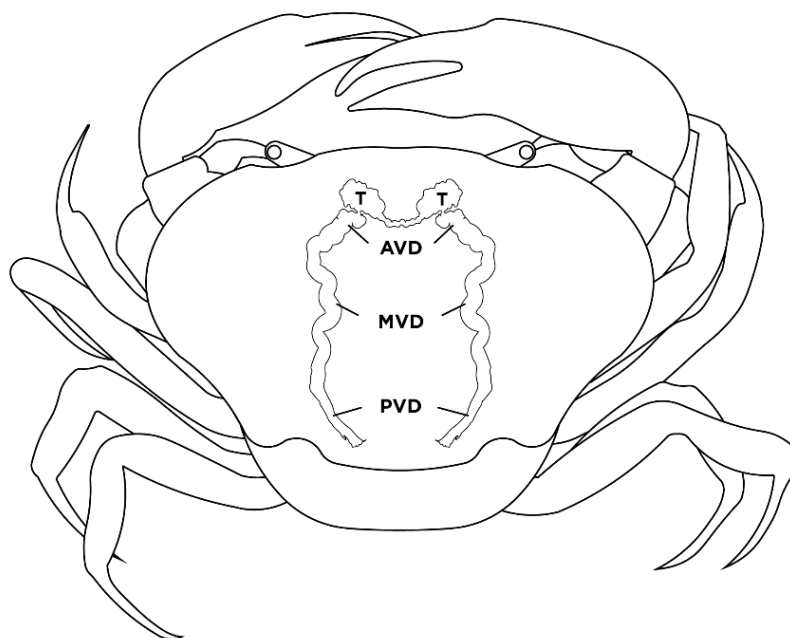


Figura 2. Desenho esquemático do Sistema Reprodutor Masculino de *F. ibiapaba* e *K. attenboroughi*. T: testículos; AVD: Vaso Deferente Anterior; MVD: Vaso Deferente Médio; PVD: Vaso Deferente Posterior.

Apresenta o formato de “H” e é composto por um par de testículos conectados a vasos deferentes (VD), que apresentam, notadamente, três regiões distintas: anterior (AVD), média

(MVD) e posterior (PVD). O testículo é um órgão tubular, comumente convoluto (Figura 3 A-B) em *F. ibiapaba*, e em *K. attenboroughi* mostra-se muito enovelado (Figura 3 E-F). Associado diretamente a esse órgão está a AVD, que é curta, convoluta e menos espessa, quando comparada às demais regiões dos VD (Figura 3 B, F). A MVD mostra-se mais espessa que a região anterior, e, nesta área, nota-se, por meio de visualização por transparência através do vaso, uma grande deposição de material com formato arredondado (Figura 3 C, G), o qual se trata da secreção de aspecto globular imersa em fluido seminal, confirmada por meio de análises histológicas e histoquímicas (para maiores detalhes, ver Figuras 5 e 6). Logo após a MVD, encontra-se a PVD, a qual é mais espessa que as demais regiões dos VD, e, por análise macroscópica, ainda se notam as secreções globulares. Porém, tal região aparenta portar secreção com caráter mais homogêneo que a MVD, principalmente, em sua porção final (Figura 3 D, H).

Vale ressaltar que nas duas espécies aqui analisadas não foi detectada a presença de glândulas acessórias associadas aos VD (Figura 3).

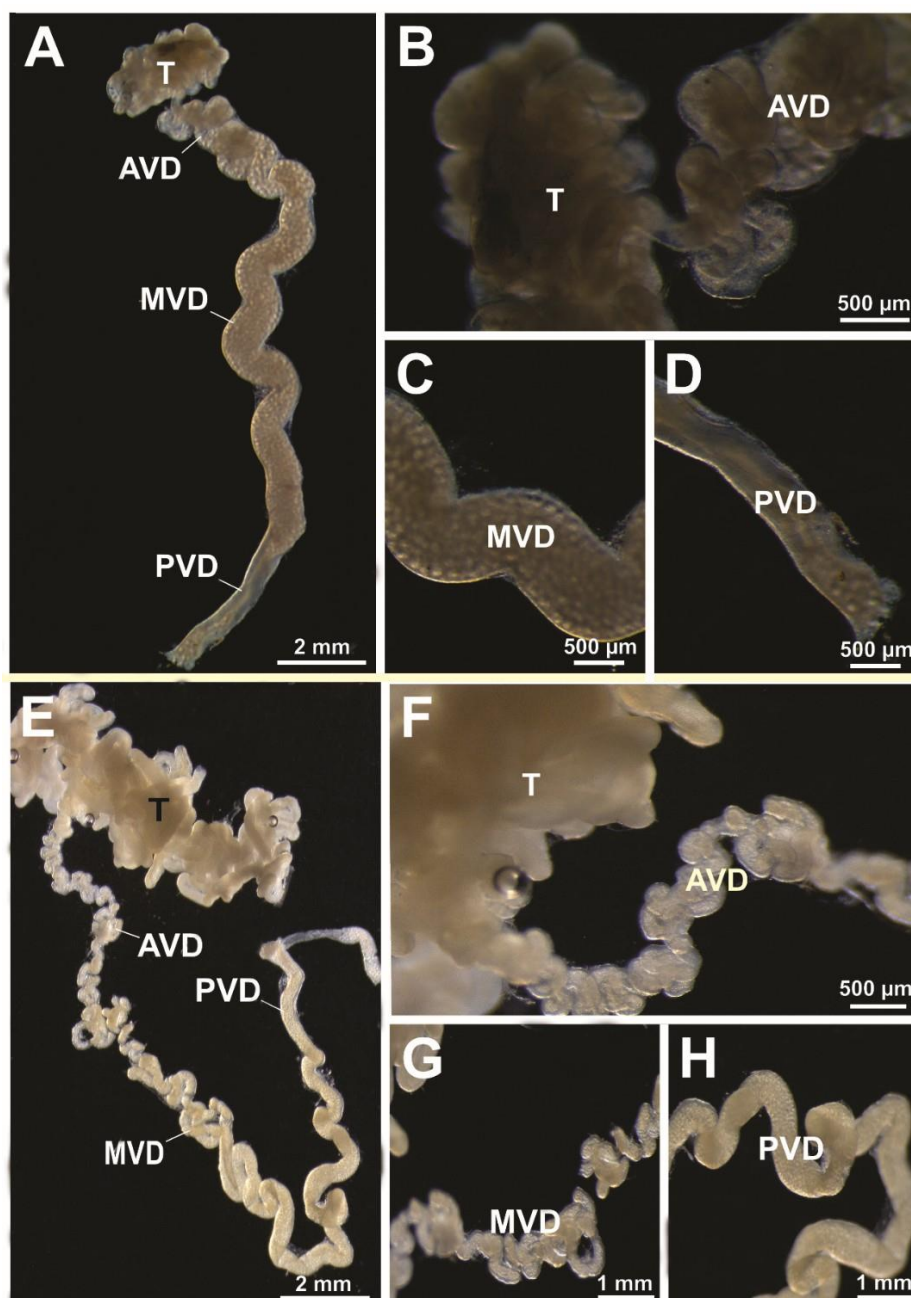


Figura 3. Anatomia do sistema reprodutor masculino (SRM) dos pseudotelfusídeos *Fredius ibiapaba* (A-D) e *Kingsleya attenboroughi* (E-H). **A.** Vista de um dos lados do SRM de *F. ibiapaba*. **B.** Detalhe do testículo conectado à AVD convoluta. **C.** Detalhe da MVD espessa exibindo grande quantidade de secreção. **D.** Detalhe da PVD preenchida por fluido seminal. **E.** Vista geral de uma das porções do SRM de *K. attenboroughi*, mostrando testículo bastante enovelado, conectado à AVD, seguida pela MVD e PVD. **F.** Detalhe do testículo conectado à AVD. **G-H.** Detalhe da MVD convoluta contendo secreção globular e da PVD mais espessa. AVD: região anterior do vaso deferente; MVD: região média do vaso deferente; PVD: região posterior do vaso deferente; T: testículo.

Os testículos são bastante volumosos, apresentando o padrão histológico do tipo tubular intermediário ou modificado, em que se observam túbulos com células em diferentes estágios de formação e túbulos com células em apenas um estágio de divisão envolvidos por tecido conjuntivo na sua porção externa (Figura 4 A).

Na zona germinativa, as espermatogônias apresentam núcleo ocupando a maior proporção da célula, onde acontecem sucessivas divisões mitóticas, e uma zona de transformação com células em meiose e zona de evacuação de espermatozóides, apresentando células em diferentes estágios de formação (Figura 4 B).

Todavia, em alguns túbulos, nota-se a presença de grande quantidade de espermatozoides na porção central do lúmen (Figura 4 A-B).

Os espermatócitos primários (Figura 4 C) apresentam núcleos menores do que os da etapa anterior e cromatina com aspectos variáveis de condensação em fase de paquíteno, com formação de quiasmas (seta preta). Os espermatócitos secundários com núcleos granulares e formação da placa metafásica (Figura 4 D) (seta preta). Em relação às Espermatídes: inicial, com núcleo significativamente menor e início da formação da vesícula proacrossomal, conforme indica a (seta branca) (Figura 4 E); com formação da vesícula acrossomal, identificada com a seta preta (Figura 4 F). Espermatozóides com acrossomo completo (cabeça de seta preta) e núcleo (cabeça de seta branca) (Figura 4 G).

A espermatogênese inicia-se com a formação das espermatogônias ($16,45 \pm 1,44 \mu\text{m}$) em uma faixa periférica do túbulo, e, comumente, estão associadas a células de Sertoli. São células arredondadas, apresentam grandes núcleos com blocos de heterocromatina evidentes e citoplasma levemente acidófilo (Figura 3 B). Já os espermatócitos ($14,23 \pm 0,90 \mu\text{m}$) podem ser divididos em primários e secundários.

Os espermatócitos primários apresentam grandes núcleos em distintas fases da prófase meiótica, sendo comum observá-los na subfase de paquíteno (Figura 4 C).

Após a divisão meiótica dessas células, os espermatócitos dão origem a dois espermatócitos secundários, os quais exibem núcleos menores com cromatina mais homogênea, quando comparados à fase anterior (Figura 4 B, D). Após outra divisão, espermatócitos secundários formarão futuras espermatídes ($8,49 \pm 0,88 \mu\text{m}$) e a espermiogênese inicia-se com as espermatídes iniciais. Estas mostram núcleos arredondados, sendo que as pequenas vesículas pró-acrossomais dessas células mostram reação para PAS (Figura 4 E). Nos estágios avançados, as espermatídes finais passam a apresentar núcleo reduzido em formato de “C”, o qual envolve a vesícula acrossomal madura (Figura 4 F). Ao fim da espermiogênese, espermatozóides ($5,20 \pm 0,47 \mu\text{m}$) com núcleos arredondados e câmara perforatorial bem delimitada (a qual caracteriza a vesícula acrossomal) são formados e encaminhados à zona de evacuação (Figura 4 A, G).

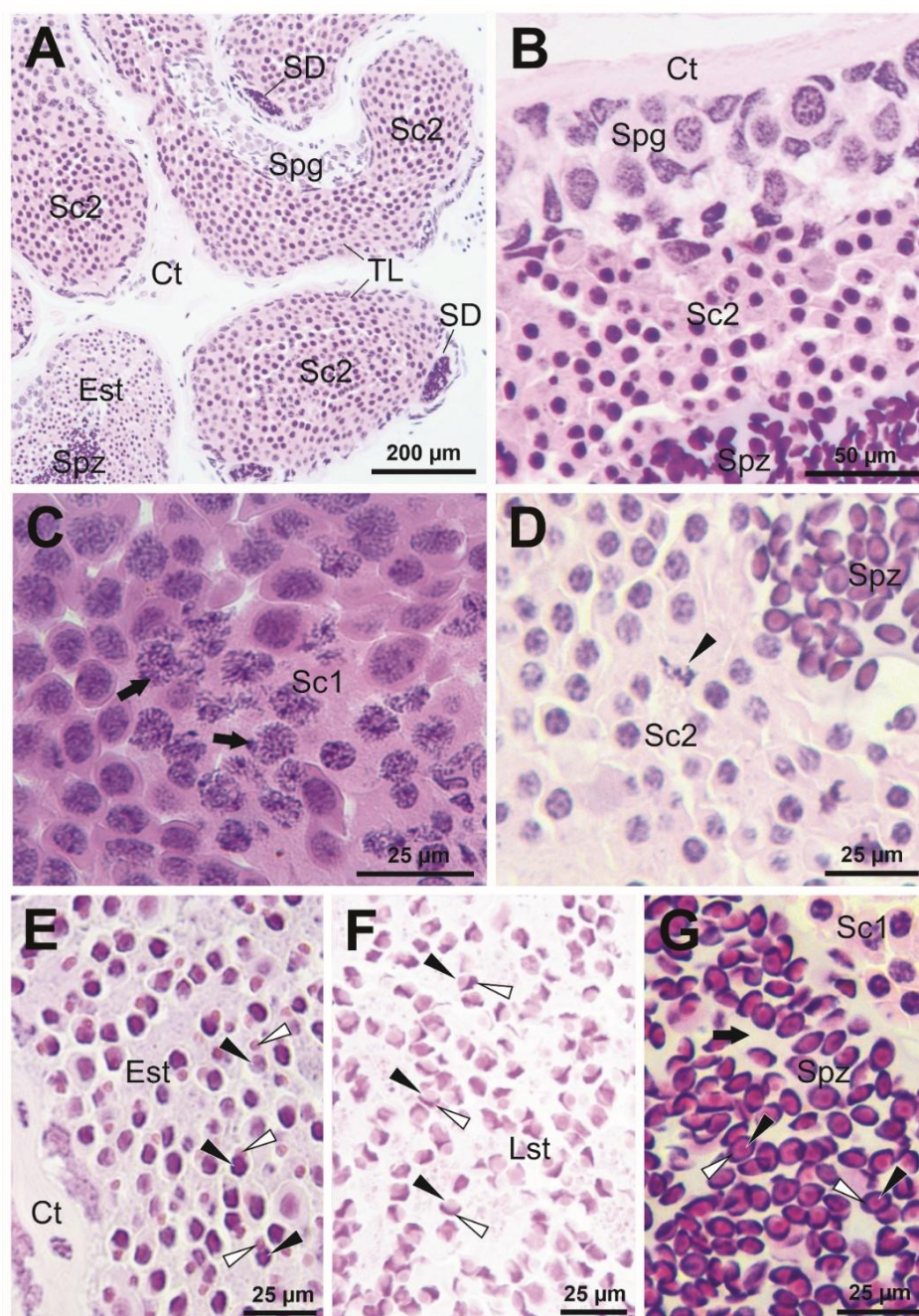


Figura 4. Padrão geral da histologia dos testículos, espermatogênese e espermiogênese *F. ibiapaba*, *K. attenboroughi* e *R. garmani* (A-B), espermatogênese (B-D) e espermiogênese (E-G). B. Os túbulos seminíferos formados por uma zona germinativa com espermatogônias, zona de transformação e zona de evacuação contendo espermatozoides, envoltos por tecido conjuntivo e uma faixa periférica contendo espermatogônias próximas a células de Sertoli, espermatócitos secundários e espermatozoides. C. Espermatócitos primários (Paquíteno) (seta preta). D. Espermatócitos secundários e espermatozoides. E. Espermátides iniciais com núcleos arredondados (cabeça de seta preta) e vesículas pró-acrossomais com marcação para a técnica de [PAS] (cabeça de seta branca). F. Espermátides finais com núcleo com formato de

“C” (cabeças de setas brancas) e vesícula acrossomal madura (cabeças de setas pretas). **G.** Espermatozoides imersos em matriz luminal (seta preta), com núcleos arredondados (cabeças de setas brancas) e ao centro a câmara perforatorial (cabeças de setas pretas), e a vesícula acrossomal. Ct: tecido conjuntivo; Est: espermátide inicial; EZ: zona de evacuação; Lst: espermátide final; Nc: célula de Sertoli; Sc1: espermátócito primário; Sc2: espermátócito secundário; Spg: espermatogônia; Spz: espermatozoides; TZ: zona de transição.

Os diâmetros das células germinativas decresceram significativamente ao longo do processo de espermatogênese e espermiogênese em pseudotelfusídeos (one-way ANOVA - df: 3, SS: 14.05, MS: 4.68, F: 2038.11, $p < 0.001$) (Figura 5).

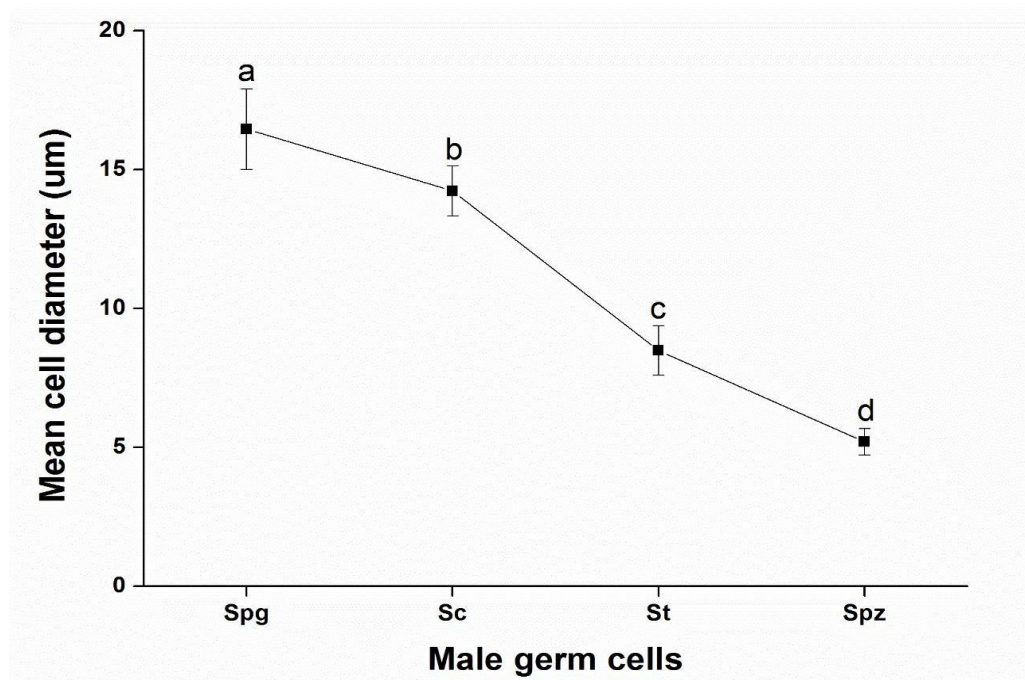


Figura 5. Variação no diâmetro nuclear durante a espermatogênese e a espermiogênese. Médias (quadrados pretos) e desvios padrões apresentados para cada tipo celular. Letras distintas indicam diferenças estatísticas entre tipos celulares. Sc: espermátócito; Spg: espermatogônia; Spz: espermatozoide; St: espermátide.

3.1 Histologia e histoquímica dos vasos deferentes

Não foram observadas diferenças nos padrões histológicos dos VD entre as três espécies de diferentes gêneros em Pseudothelphusidae (Figura 6 A). Na AVD, inicia-se a deposição de uma secreção acidófila (eosinophil) de aspecto globular em *K. attenboroughi* e *F. ibiapaba* (Figura 6 A-F), a qual não foi encontrada em *R. garmani* (Figura 6 H-J). A AVD mostra epitélio colunar simples, com núcleos na porção basal apresentando basofilia e citoplasma levemente basófilo. No lúmen, nota-se grande quantidade de espermatozoides imersos na secreção tipo I, que forma a matriz do fluido seminal acidófilo, quase imperceptível devido ao elevado número de gametas masculinos (Figura 6 B-D). De forma geral, as demais regiões do vaso, a MVD e a PVD demonstram os mesmos aspectos histológicos, quando comparados a AVD, sendo compostas por um epitélio colunar simples envolto por delgada camada de musculatura. Porém, em *K. attenboroughi* (Figura 6 A-D) e em *F. ibiapaba* (Figura 6 E-G) o epitélio é claramente mais acidófilo que em *R. garmani* (Figura 6 H-J). A secreção luminal da MVD e da PVD é praticamente a mesma, mas se verifica maior quantidade de secreção tipo II, com aspecto de glóbulos acidófilos menores em *K. attenboroughi* (Figura 6 A-D) e maiores em *F. ibiapaba* (Figura 6 E-G), e com forma irregular, basófilos e pequenos em *R. garmani* (Figura 5 H-J) em todas as espécies, a secreção do tipo II é sempre mais abundante em direção às porções distais do VD, principalmente na PVD (Figura 6 D, G e J), em que não foram observadas glândulas acessórias (Figura 6).

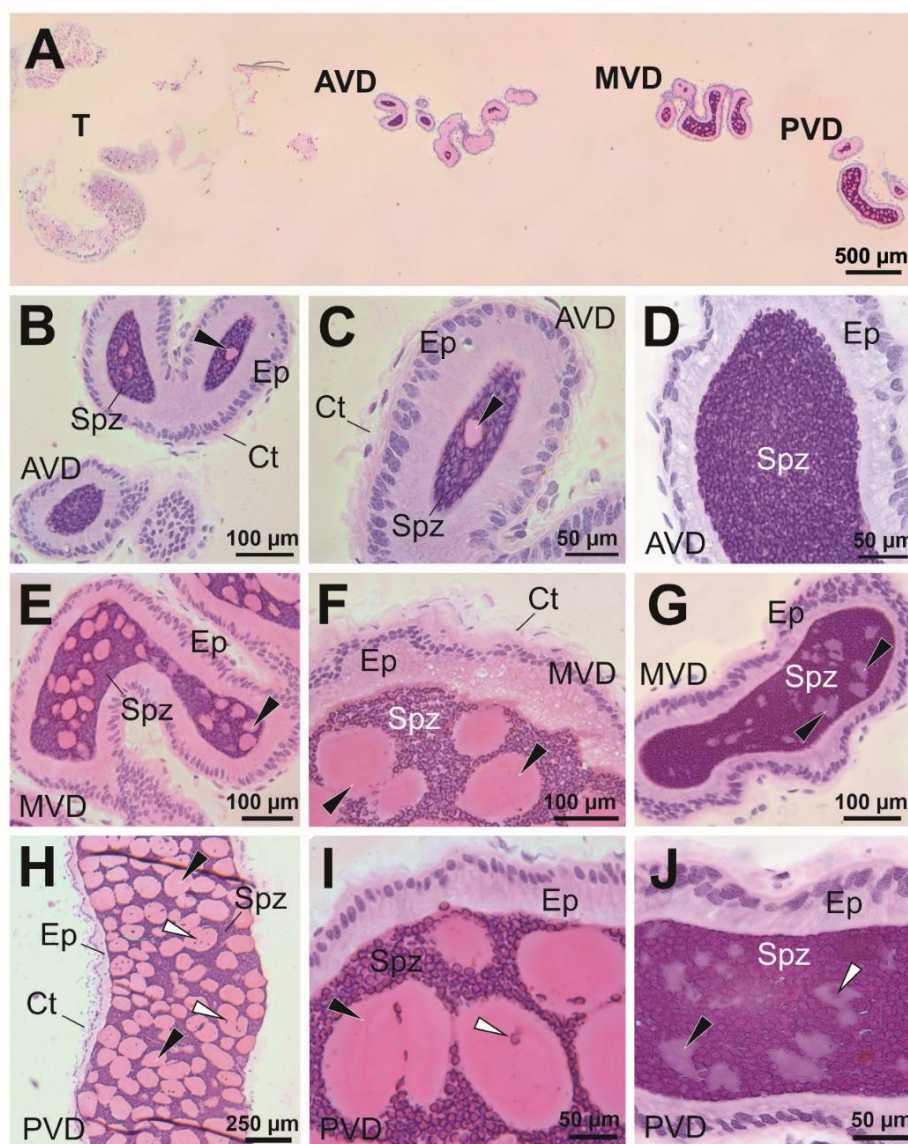


Figura 6. Histologia do sistema reprodutor masculino evidenciando o padrão geral deste em pseudotelfusídeos. [HE] **A, B, E, H:** *Kingsleya attenboroughi*; **C, F, I:** *Fredius ibiapaba*; **D, G, J:** *Rodriguezus garmani*. **B-D.** Aspecto geral da AVD, epitélio colunar simples de citoplasma acidófilo; observa-se a presença de outro tipo de secreção acidófila de aspecto globular entremeando os espermatozoides (cabeças de setas pretas). **E-G.** A MVD, epitélio envolto por tecido conjuntivo e espermatozoides imersos em secreção acidófila (cabeças de setas pretas). **H-J.** A PVD de pseudotelfusídeos apresenta as mesmas características histológicas da MVD, além de acréscimo na quantidade de secreção de aspecto globular depositada nesta região do vaso (cabeças de setas pretas) e espermatozoides imersos nessa secreção globular (cabeças de setas brancas). AVD: região anterior do vaso deferente; Ct: tecido conjuntivo; Ep: epitélio; MVD: região média do vaso deferente; PVD: região posterior do vaso deferente; Spz: espermatozóides: testículos.

A característica histoquímica foi a mesma ao longo da VD. Ou seja, não foram detectadas diferenças nos padrões histoquímicos na PVD de *F. ibiapaba*, *K. attenboroughi* e *R. garmani* (Figura 7) histoquimicamente. A secreção tipo I fluídica e homogênea é glicoproteica (Figura 7 A-F), com pequena reatividade para polissacarídeos ácidos (Figura 7 G-I). A secreção tipo II é globular em *K. attenboroughi* e *F. Ibiapaba*, e irregular em *R. garmani*, fortemente glicoproteica e com intensa reação para proteínas, principalmente na medula dos glóbulos (Figura 7 A-C). Os polissacarídeos neutros mostram intensa reatividade no glóbulo como um todo, sendo a córtex mais intensa (Figura 7 D-F) para polissacarídeos ácidos, somente a córtex dos glóbulos foi positiva para o Azul de Alcian (Figura 7 G-I). Não foram detectadas diferenças nos padrões histoquímicos na PVD de *F. ibiapaba*, *K. attenboroughi* e *R. garmani* (Figura 7). Histoquimicamente, a secreção homogênea em que os espermatozoides estão imersos é de difícil visualização devido à grande quantidade dessas células, é fracamente positiva para proteínas (Figura 7 A-C), fortemente reativa a polissacarídeos neutros (Figura 7 D-F) e reativa a polissacarídeos ácidos (Figura 7 G-I). Já a secreção globular que entremeia os espermatozoides apresenta reação moderada a intensa para proteínas (Figura 7 A-C), é fortemente reativa para polissacarídeos neutros (Figura 7 D-F) e negativa para polissacarídeos ácidos (Figura 7 G-I). Vale ressaltar que a região cortical das secreções globulares apresenta forte reação para as técnicas de proteínas e polissacarídeos neutros e ácidos (Figura 7).

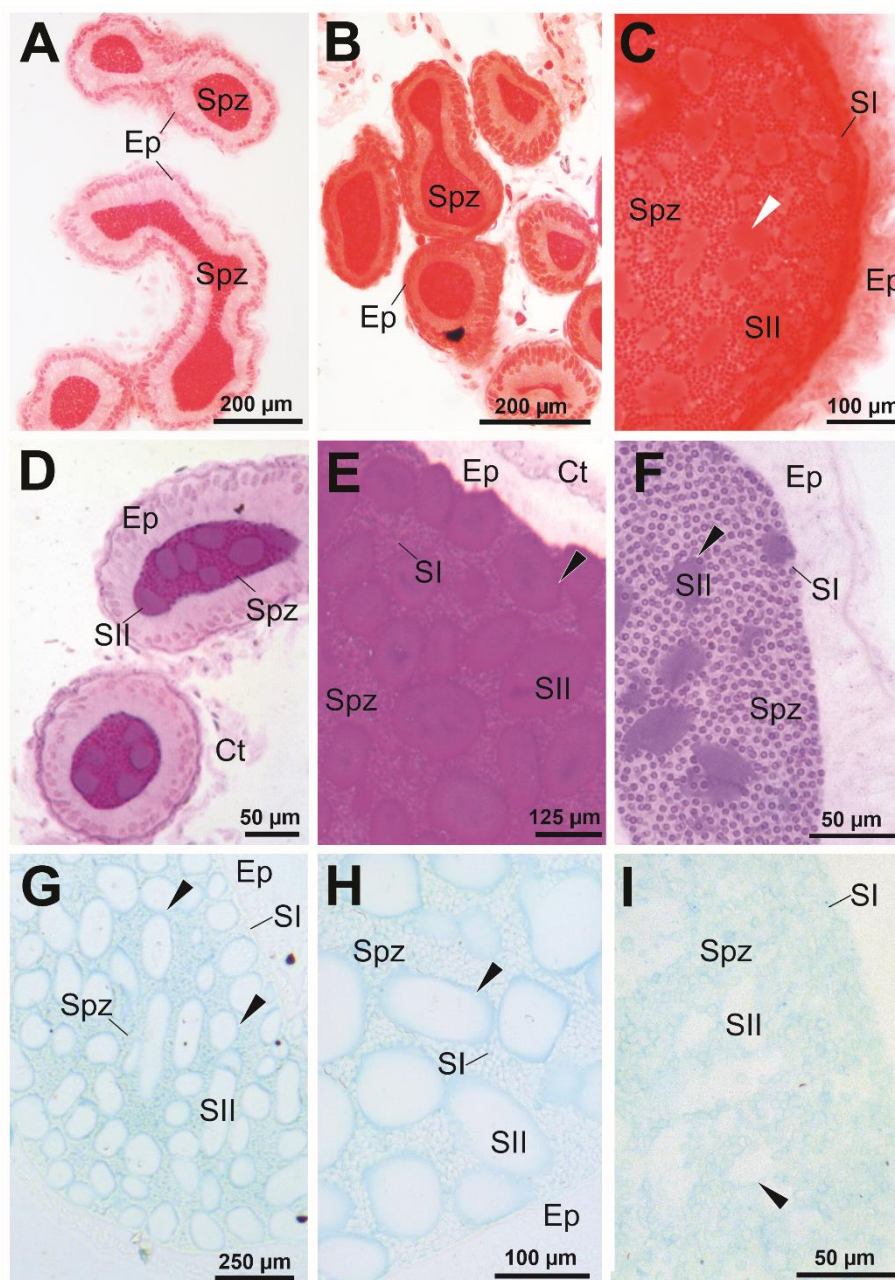


Figura 7. Histoquímica da PVD em pseudotelfusídeos. **A-D-G:** *Kingsleya attenboroughi*; **B-E-H:** *Fredius ibiapaba*; **C-F-I:** *Rodriguezus garmani*. **A-C.** O fluido seminal em que os espermatozoides estão imersos mostra fraca reação para a técnica de proteínas (cabeças de setas brancas). A secreção globular que entremeia os espermatozoides apresenta reação moderada a intensa para proteínas, a região cortical destas secreções apresenta forte reação para tal técnica (cabeças de setas pretas) [Xylidine ponceau]. **D-F.** O fluido seminal (cabeças de setas brancas) e as secreções globulares mostram forte reação para polissacarídeos neutros. Note que a região cortical das secreções globulares apresenta intensa reação para tal técnica (cabeças de setas pretas) [PAS]. **G-I.** Reação positiva para polissacarídeos ácidos no fluido seminal (cabeças de setas brancas) e ausência de reação técnica nas secreções globulares. No entanto, a região

cortical das secreções globulares mostra reação positiva para polissacarídeos ácidos (cabeças de setas pretas) [Alcian blue pH 2,5]. Ct: tecido conjuntivo; Ep: epitélio; SI: secreção tipo I; SII: secreção tipo II: secreção; SZ: espermatozoide.

3.2 Ultraestrutura do vaso deferente e do fluido seminal

As três espécies de Pseudothelphusidae apresentam o mesmo padrão ultraestrutural das células que compõem o epitélio colunar simples, ao longo da PVD. Assim, *K. attenboroughi* foi utilizada como modelo para descrição celular. As células epiteliais estão assentadas sobre camada muscular, a qual é um pouco mais espessa na PVD e no tecido conjuntivo abaixo desta (Figura 8 A-C). As células epiteliais são tipicamente secretoras, com núcleos basais e retículo endoplasmático rugoso (RER) com cisternas paralelas, sendo esta organela a mais abundante, ocupando a maior parte do citoplasma, desde o pólo basal até o apical, marcado por microvilosidades homogêneas, conjuntos de fibras musculares oblíquas caracterizam a musculatura e abaixo delas, fibroblastos do tecido conjuntivo, ricos em mitocôndrias e RER fazem o limite do VD com a hemolinfa (Figura 8 B e C). As células musculares apresentam lâmina basal espessa sendo a das células epiteliais mais delgadas, ambas na sua maioria mais eletrodensas (Figura 8 C). No polo basal, as células possuem muitas invaginações da membrana plasmática basal (Figura 8 C), as quais percorrem boa parte deste polo até próximo do núcleo. Por entre estas invaginações da membrana plasmática basal, verificam-se várias interdigitações, que são sinuosidades típicas do polo apical para garantir aderência entre uma célula e outra e uma grande quantidade de mitocôndrias e RER (Figura 6 D). No polo apical, as células estão unidas por complexos juncionais, com junção de oclusão, seguida pela aderente (Figura 7 E). Após a junção de aderência, junções septadas garantem a adesão célula-célula ao longo da margem lateral desde o pólo apical ao basal (Figura 8 G). No polo apical, notam-se vários complexos de Golgi e RER (Figura 8 G). No complexo de Golgi, notam-se vesículas

provenientes do elemento de transição chegando na face *cis* sendo estas vesículas menos eletrodensas, e na face *trans* brotam muitas pequenas vesículas de secreção com duas características: uma eletrodensa e outras com secreção muito menos eletrodensa (Figura 8 H) No polo apical, não existe acúmulo de vesículas de secreção, sendo observadas várias vesículas eletrodensas e outras menos eletrodensas, sendo ambas eliminadas por exocitose, caracterizando uma secreção tipo merócrino (Figura 8 I e J).

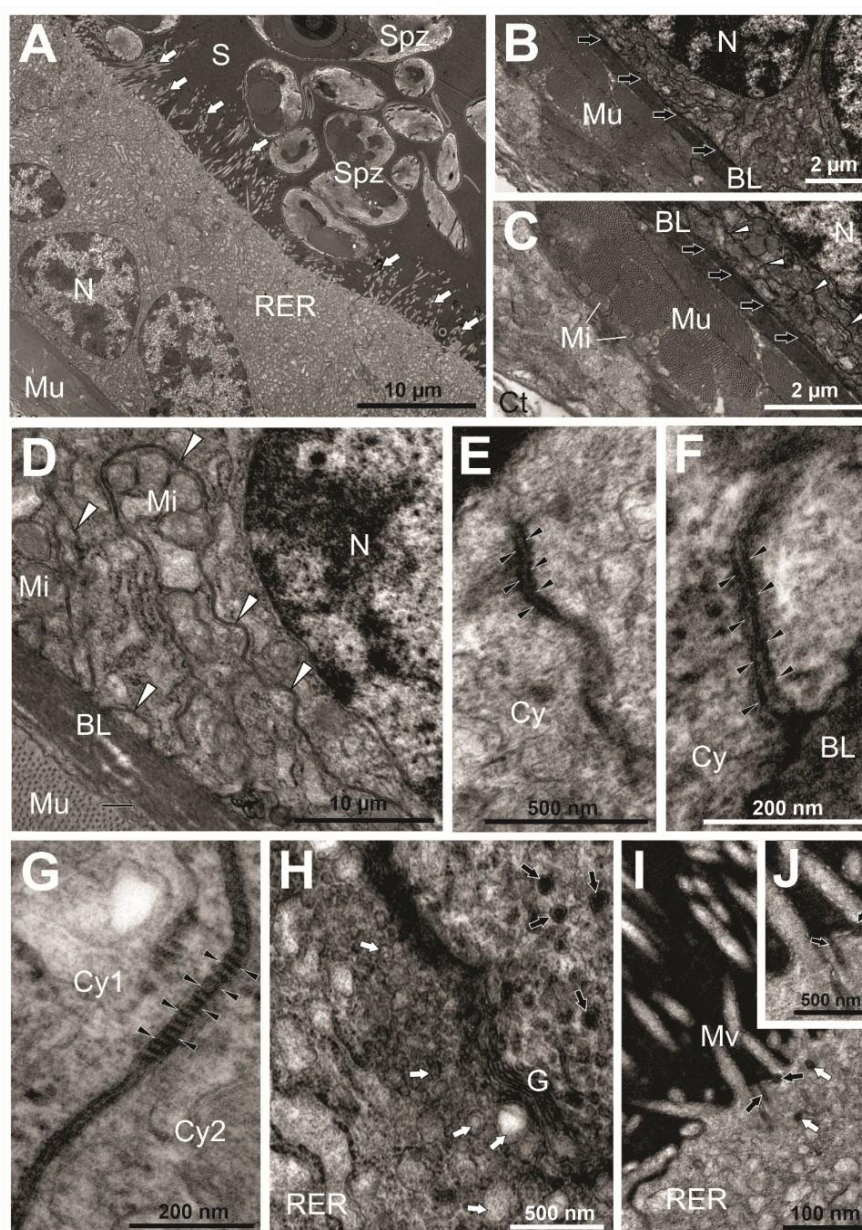


Figura 8. Ultraestrutura da PVD em pseudotelfusídeos *Kinsgleya attenboroughi*. **A.** epitélio

composto por células colunares com Retículo Endoplasmático Rugoso (RER) bem desenvolvido e microvilosidades (setas brancas). **B-C**. Observe duas camadas musculares (transversal e longitudinal), as células do epitélio apresentam espessa lâmina basal eletrodensa (setas pretas) com interdigitações e mitocôndrias (cabeças de setas brancas). **D-E-F**. Polo basal apresentando muitas mitocôndrias e interdigitações (cabeças de setas brancas), polo apical evidenciando uma junção aderente (cabeças de setas pretas) e pólo basal com interdigitação associada à lâmina basal (cabeças de setas pretas). **G**. Junção septada (cabeças de setas pretas). **H**. RER com vesículas eletrolúcidas à face *cis* do complexo de Golgi (setas brancas), enquanto na face *trans* desta organela, as vesículas eletrodensas (setas pretas). **I-J**. Polo apical mostrando grande quantidade de microvilosidades, vesículas eletrodensas (setas brancas), e microvilosidades (setas pretas). BL: lâmina basal; Ct: tecido conjuntivo; Cy: citoplasma; Cy1: citoplasma da célula 1; Cy2: citoplasma da célula 2; G: complexo de Golgi; Mi: mitocôndria; Mu: músculo; Mv: microvilosidades; N: núcleo; RER: retículo endoplasmático rugoso; S: secreção; Spz: espermatozoide.

De forma geral, o fluido seminal em pseudotelfusídeos analisados sob MET apresenta a mesma configuração para as três espécies, sendo possível observarmos espermatozoides em espermatóforos cleistospérmicos imersos em secreção do tipo 1 eletrodensa, e ao redor destas células, encontramos a secreção do tipo 2 de aspecto globular ou arredondado mostrando material eletrolúcido.

Todavia, notam-se pequenas distinções no aspecto do material que compõe as secreções de cada espécie (Figura 9). Em *F. ibiapaba*, a secreção do tipo 1 é eletrodensa e tem aspecto irregular, apresentando grânulos pouco eletrodensos em sua composição, enquanto os glóbulos de secreção do tipo 2 são eletrolúcidos e mostram aspecto lamelar a sinuoidal, e possivelmente são formados por fusões de vários glóbulos eletrolúcidos menores (Figura 9 A-B). Já a secreção do tipo 1 em *K. attenboroughi* é eletrodensa, homogênea e mostra aspecto granular. Entremeados entre esta secreção e espermatozoides, observam-se os glóbulos da secreção do tipo 2, eletrolúcidos, de aspecto granular, com grânulos pouco eletrodensos em sua composição (Figura 9 C-D). Em *R. garmani*, a secreção do tipo 1 é granular, homogênea e eletrodensa. Por

outro lado, os glóbulos da secreção do tipo 2 apresentam a medula eletrolúcida, homogênea e de aspecto granular, e sua córtex é formada por material eletrodenso e granular. Glóbulos eletrolúcidos de tamanhos reduzidos podem ser observados próximos à glóbulos maiores de secreção do tipo 2, indicando que a formação desse tipo de secreção ocorre por fusão (Figura 9 E-G).

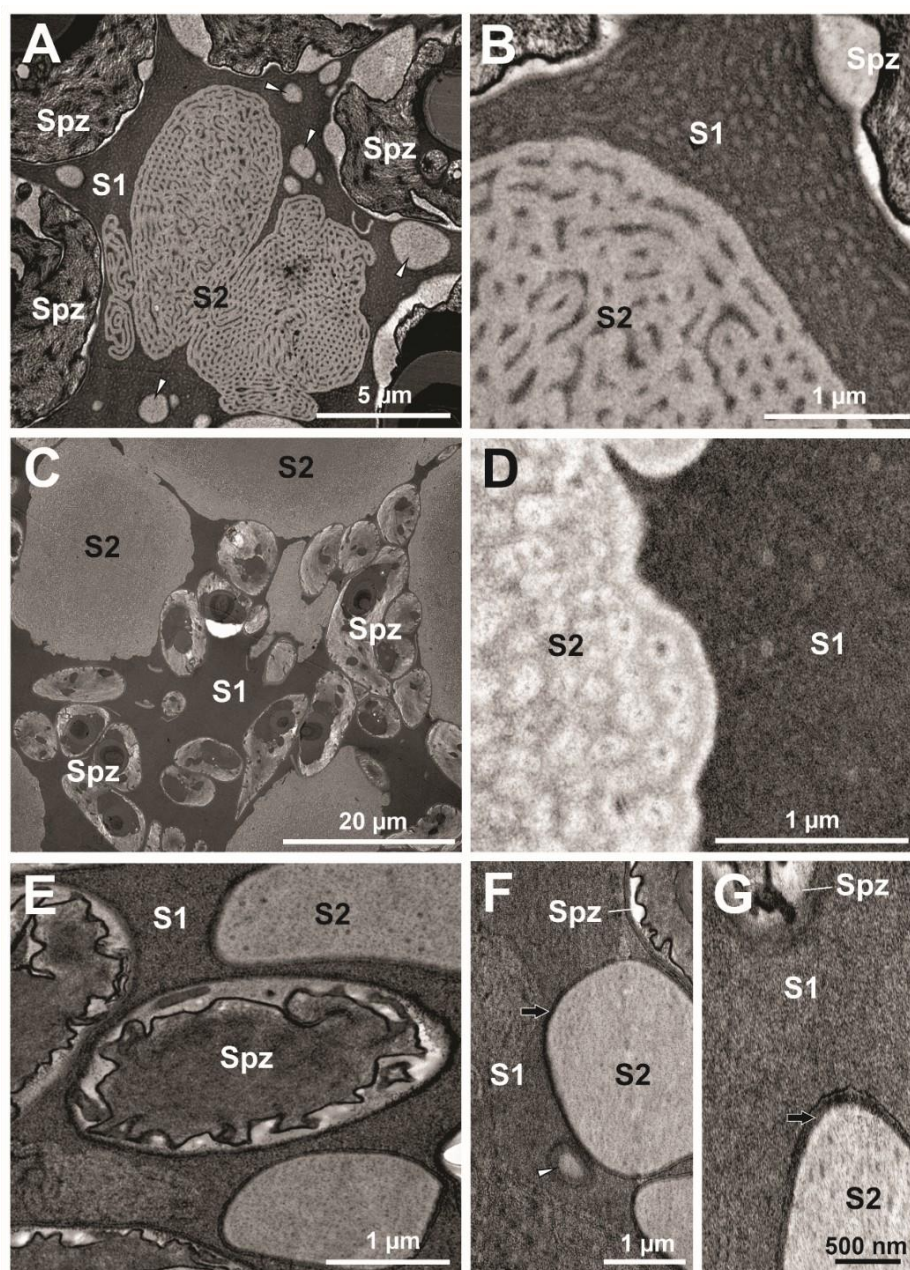


Figura 9. Ultraestrutura das secreções seminais em pseudotelfusídeos. **A-B.** Em *Fredius ibiapaba*, a secreção do tipo 1, na qual os espermatozoides estão imersos, é eletrodensa e nota-

se presença de grânulos pouco eletrodensos. A secreção do tipo 2 é eletrolúcida, tem aspecto lamelar a sinuissodal (cabeças de setas brancas). **C-D.** Em *Kingsleya attenboroughi*, a secreção do tipo 1 é eletrodensa, homogênea e mostra aspecto granular. A secreção do tipo 2 é eletrolúcida, de aspecto granular e possui grânulos pouco eletrodensos. **E-G.** Em *Rodriguezus garmani*, a secreção do tipo 1 mostra-se granular, homogênea e eletrodensa. Já a secreção do tipo 2 é eletrolúcida, homogênea e de aspecto granular, com exceção de sua região cortical, que é formada por material eletrodense e granular (setas pretas). Eletrolúcidos menores (cabeça de seta branca). S1: secreção do tipo 1; S2: secreção do tipo 2; Spz: espermatozoide.

3.3 Discussão

O sistema reprodutor masculino das três espécies deste estudo apresenta o padrão típico observado em Brachyura, um órgão bilateral em formato de “H”, composto por um par de testículos conectados a um par de vasos deferentes, divididos em três regiões distintas: anterior (AVD), média (MVD) e posterior (PVD) (Antunes et al., 2018; Diesel, 1989; Krol et al., 1992; López-Greco, 2013; Nascimento & Zara, 2013; Tiseo et al., 2014; Watanabe et al., 2020; Zara et al., 2012).

Apesar de apresentarem proximidade filogenética e hábitos de vida similares aos pseudotelfusídeos aqui analisados, divergem dos tricondactídeos amazônicos *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861 e *Sylviocarcinus pictus* H. Milne Edwards, 1853, pois mostram um padrão morfológico testicular bastante distinto quando comparados a esse grupo, apresentando o órgão com formato de “U invertido” (De Oliveira & Zara, 2018). Estes mesmos autores verificaram a presença de glândulas acessórias na encontradas na PVD desses animais, responsáveis por produzir a maior parte da secreção seminal de aspecto fluido nesse grupo, e estão diretamente relacionadas ao armazenamento de espermatóforos nos VD desses animais, padrão totalmente divergente daquele observado nos caranguejos analisados no presente estudo, que não apresentam glândulas acessórias.

Os testículos podem ser classificados como do tipo tubular modificado, uma vez que em uma mesma seção transversal, notam-se em alguns túbulos seminíferos a presença das três zonas típicas, características de testículos tubulares: a zona germinativa periférica contendo espermatogônias, a zona de transformação central contendo espermatócitos e espermátides, e as zonas de evacuação distolaterais preenchidas por espermatozóides, que serão encaminhados a AVD. Por outro lado, em alguns túbulos é possível observarmos células germinativas em um mesmo estágio da meiose, preenchendo totalmente tais estruturas, característica mais próxima dos testículos lobulares (Minagawa et al., 1994; Nagao & Munehara, 2003). Esse padrão atípico também foi registrado para tricodactílideos amazônicos *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861 e *Sylviocarcinus pictus* H. Milne Edwards por De Oliveira e Zara (2018).

A espermatogênese e a espermiogênese foram processos idênticos para as três espécies de pseudotelfusídeos, por se tratar de um processo muito conservativo em espécies aquáticas (Jamieson, 1991).

A espermiogênese em pseudotelfusídeos mostra similaridades ao processo observado em Trichodactylidae, onde nas espermátides iniciais ocorre a formação da vesícula proacrossomal, a qual amadurecerá nas espermátides finais, que apresentam núcleo reduzido em formato de “C”. Ao fim deste processo, espermatozoides de núcleos arredondados apresentando câmara perforatorial facilmente visível por microscopia de luz são formados e esses gametas alcançarão a AVD (De Oliveira & Zara, 2018).

Os vasos deferentes em Pseudothelphusidae deste estudo podem ser considerados tubos simples e contínuos, apresentando epitélio colunar desde o início ao final dessas estruturas. Histologicamente e histoquimicamente, as três regiões dos VD não mostraram diferenças estruturais e foram divididas entre si apenas pelo incremento da espessura do vaso em sentido caudal e considerável aumento da secreção globular do tipo 2, em direção à porção final da PVD.

Apesar de verificarmos as três regiões típicas nos VD das espécies aqui analisadas, são produzidas apenas duas secreções de caráter glicoproteico ao longo da extensão dessas estruturas, não havendo grande complexidade na formação de espermatóforos quando comparamos esses animais a outros caranguejos thoracotrematas e heterotrematas filogeneticamente próximos (Wolfe et al., 2023).

Nos caranguejos de água doce, Gecarcinucidae - *Sundathelphusa philippina* (von Martens, 1868), analisados por Klaus et al. (2013), Trichodactylidae, *D. pagei* Stimpson, 1861 e *S. pictus* H. Milne Edwards, 1853 por De Oliveira and Zara (2018), nos caranguejos marinhos, Grapsidae - *Pachygrapsus gracilis* (Saussure, 1857) e *Pachygrapsus transversus* (Gibbes, 1850), analisados por Tiseo et al. (2014), Majidae - *Maja brachydactyla*, analisados por Simeó et al. (2009), e Portunidae - *Callinectes bocourti* A. Milne-Edwards 1879, *Callinectes danae* Smith, 1869, *Callinectes exasperatus* (Gerstaecker, 1856), *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 e *Callinectes sapidus* Rathbun, 1896, analisados por Nascimento e Zara (2013), Watanabe et al. (2020) e Zara et al. (2012), é possível observamos duas porções na AVD, sendo a porção anterior ou AVDp, responsável por receber os espermatozóides advindos dos testículos e misturá-los a secreções glicoproteicas. Posteriormente, na porção distal ou AVDd, ocorrerá o empacotamento dos espermatozoides nos espermatóforos, tais estruturas carreadoras serão remetidas à MVD e à PVD, ainda nesta última região dos VD há a produção de fluido seminal. Somado a isso, é na MVD ou na PVD, ou ainda nas duas regiões, onde se verifica as glândulas acessórias nesses animais, as quais adicionam conteúdo ao fluido seminal são responsáveis pela formação de pacotes ou plugues espermáticos, promovendo maior complexidade na competição espermática nesses grupos.

Outro fator importante a ser considerado é a ausência de espermatóforos na PVD, nas espécies estudadas, uma característica que parece desempenhar um papel crucial na formação de pacotes espermáticos. Esse fenômeno foi observado em Trichodactylidae (De Oliveira &

Zara, 2018) e em Inachoididae (Antunes et al., 2016; Antunes et al., 2018; Diesel, 1989; Diesel, 1991), bem como em formadores de plugues espermáticos, como Portunidae (Assugeni et al., 2021; Watanabe et al., 2020; Watanabe et al., 2022; Zara & Nascimento, 2013; Zara et al., 2012).

Em Trichotactylidae, embora *Sylviocarcinus pictus* e *Goyazana castelnaui* (H. Milne-Edwards, 1853) tenham sido inicialmente descritos com espermatóforos na PVD (Almeida et al., 2019; Silva et al., 2012), essas descrições apresentam falhas na interpretação e no posicionamento anatômico. O estudo de Silva et al. (2012) não apresenta imagens da PVD contendo espermatóforos, e o trabalho de Almeida et al. (2019) mostra apenas duas fotos, uma das quais exibe uma glândula acessória com matriz espermatófórica, interpretada como de um animal imaturo, o que impossibilita a confirmação da presença de espermatóforos na PVD.

Apesar de *Sylviocarcinus pictus* e *Goyazana castelnaui* H. Milne-Edwards, 1853 terem sido descritos com espermatóforos na PVD (Almeida et al., 2019; Silva et al., 2012), esses resultados podem ser indicativos de falhas no posicionamento das estruturas na descrição da anatomia do VD, pois no trabalho de Silva et al. (2012) não há nenhuma imagem da PVD com espermatóforos, enquanto Almeida et al. (2019) apresentam apenas duas fotos, sendo uma delas de glândula acessória contendo matriz espermatófórica, interpretada como animal imaturo, não sendo possível comprovar a presença de espermatóforos na PVD. O que foi observado é a ausência de espermatóforos na PVD e a presença de glândulas acessórias, como observado no trabalho com *S. pictus* (Olivera & Zara, 2018) e também em *Goyazana castelnaui*, provenientes do Parque do Cristalino, MT, Brasil (Zara. dados não publicados). Esses achados indicam que a anatomia reprodutiva dessas espécies é distinta da observada em outros grupos, como os mencionados, e reforçam a necessidade de revisão das descrições anatômicas anteriores.

Para as famílias do Velho Mundo, ao que parece, os espermatozóides e/ou espermatóforos ocorrem na PVD de *Potomon fluviatilis* Rathbun, 1904 (Potamidae) e com

muitas incertezas anatômicas e histológicas, também em Gecarcinucidae (Banumathi et al., 2013; Dineshan & Devi, 2019; Scalici et al., 2010; Sherkhane et al., 2010).

O fluido seminal em *F. ibiapaba*, *K. attenboroughi* e *R. garmani* é composto por duas secreções de caráter glicoproteico. A secreção do tipo 1, na qual os espermatozoides estão imersos, mostrou intensa reação para polissacarídeos neutros e reatividade para proteínas e polissacarídeos ácidos. Já a secreção globular do tipo 2 mostrou forte reação para proteínas e polissacarídeos neutros em sua medula e intensa reação para todas as demais técnicas em sua região cortical. Seguindo o padrão observado em outros crustáceos decápodes (Andrioli et al., 2024; Fransozo et al., 2016; Paschoal & Zara, 2020) e demais braquiúros (Antunes et al., 2018; Nascimento & Zara, 2013; Tiseo et al., 2014; Watanabe et al., 2020; Zara et al., 2012), a secreção do tipo 1 em pseudotelfusídeos tem a função de promover a maturação e a viabilidade dos espermatozoides. Todavia, a presença de polissacarídeos ácidos em sua composição difere do padrão registrado para tricotactídeos, em que tal componente é ausente (De Oliveira & Zara, 2018).

Assim, acreditamos que nessas espécies aqui estudadas, logo após a emissão do ejaculado no receptáculo seminal da fêmea, os polissacarídeos ácidos que permeiam os glóbulos da secreção do tipo 2 auxiliem na rápida deiscência dos spermatóforos cleistospérmicos, liberando os espermatozoides no fluido seminal. Imediatamente após o rompimento da parede dos spermatóforos, o restante do material advindo dos glóbulos da secreção do tipo 2, juntamente com a secreção do tipo 1, promoverão a adesão do material ao receptáculo seminal da fêmea, evitando perda de espermatozóides durante a transferência espermática. Todavia, estudos envolvendo comportamento de cópula e análise histológica do receptáculo seminal de fêmeas em Pseudothelphusidae fazem-se necessários para comprovar tais hipóteses.

As células do epitélio dos VD em Pseudothelphusidae apresentam o mesmo padrão de

secreção que células de mecanismo merócrino que produzem glicoproteínas. No epitélio desses caranguejos dulcícolas foram observadas células com lâmina basal apresentando inúmeras interdigitações, e entre estas estruturas, diversos poliribossomos e mitocôndrias, o que possivelmente está relacionado a trocas iônicas nas regiões de secreções dos VD desses animais. Possivelmente, tal padrão ultraestrutural seja o mais comum para braquiúros em geral, sendo descritos para caranguejos Podotremata (Dromiidae - Garcia Bento et al., 2018) e Heterotremata marinhos (Epialtidae - Hinsch & Walker, 1974; Majidae - Simeó et al. 2009; e Portunidae - Watanabe et al., 2020).

Somado a isso, pode-se verificar que as células do epitélio são conectadas umas às outras por junções aderentes, as quais promovem estabilidade mecânica ao epitélio, e, ainda, em algumas áreas, nota-se a presença de junções septadas reforçando tal adesão, as quais, possivelmente, também podem atuar como barreira oclusiva para o transporte celular e podem estar envolvidas no transporte transepitelial de água, íons e outras substâncias (Kunčič et al., 2022). O citoplasma das células epiteliais apresenta RER bastante desenvolvido ocupando grande parte da célula, sendo possível observar próximos as cisternas dessa organela, complexos de Golgi recebendo vesículas eletrolúcidas, as modificando e remetendo vesículas eletrodensas ao lúmen por meio do processo de exocitose, seguindo o padrão tradicional de transporte celular descrito na Biologia Celular (para revisão, veja Alberts et al., 2018; Pollard et al. 2016).

3.4 Conclusão

As características morfológicas do sistema reprodutor masculino de Pseudothelphusidae, representadas pelas espécies: *F. ibiapaba*, *K. attenboroughi* e *R. garmani*, revelam uma estrutura de tubo simples, sem glândulas acessórias, em contraste com o da família Trichodactylidae. Esses dados sugerem que os caranguejos de água doce Neotropicais seguiram uma história evolutiva distinta, o que se reflete nas particularidades do sistema reprodutor masculino descritas neste estudo. Dessa maneira, aumentamos o coro de ter ocorrido um evento distinto na invasão de caranguejos da água doce Neotropical.

Além disso, os dados apresentados poderão orientar futuros estudos sobre os aspectos reprodutivos deste grupo, especialmente considerando as mudanças ambientais e os impactos das atividades antrópicas em seu habitat. Esses resultados servem como base para pesquisas futuras, que visem a implementação de medidas de conservação e proteção das áreas de ocorrência dessas espécies, essenciais para sua preservação.

CAPÍTULO 2

Ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozóides de espécies da família

Pseudothelphusidae (Malacostraca: Decapoda: Brachyura)

Resumo

A ultraestrutura de espermatóforos e espermatozoides de caranguejos de água doce, especialmente da família Pseudothelphusidae, é pouco conhecida. Neste estudo, descrevemos e comparamos a ultraestrutura de espermatóforos e espermatozoides de *Fredius ibiapaba*, *Kingsleya attenboroughi*, *Rodriguezus garmani*, *Kingsleya* sp. nov. e *Melothelphusa apiaka*. Além disso, realizamos uma análise comparativa com outras espécies de caranguejos de água doce descritas na literatura especializada. Todas as espécies estudadas apresentaram espermatóforos predominantemente cleitospermicos. Os espermatozóides das cinco espécies compartilham um padrão comum encontrado em Brachyura, com o opérculo imperfurado e uma região subopercular menos eletrodensa abaixo do opérculo, além da ausência de botão apical. Nossos resultados mostram que a vesícula acrossomal é esférica ou elíptica, com zonas acrossomais concêntricas, sendo parcialmente envolvida pelo núcleo, e com braços radiais. A vesícula acrossomal é formada por quatro zonas: interna, zona acrossomal raiada, externa e periférica. As análises ultraestruturais apresentadas neste estudo poderão ampliar a compreensão e preencher as lacunas existentes nas relações de parentesco entre as famílias de caranguejos de água doce, contribuindo para o avanço do conhecimento sobre a biologia reprodutiva e além de fornecer subsídios para sua conservação e preservação.

Palavras-chave: ultraestrutura, caranguejos de água doce, Pseudothelphusidae, biologia reprodutiva

Abstract

The ultrastructure of spermatophores and spermatozoa in freshwater crabs, particularly those from the Pseudothelphusidae family, is poorly understood. In this study, we describe and compare the ultrastructure of spermatophores and spermatozoa in *Fredius ibiapaba*, *Kingsleya attenboroughi*, *Rodriguezus garmani*, *Kingsleya* sp. nov., and *Melothelphusa apiaka*. Additionally, we performed a comparative analysis with other freshwater crab species described in the literature. All studied species exhibited predominantly cleistospermatic spermatophores. The spermatozoa of the five species share a common pattern found in Brachyura, with an imperforate operculum and a less electron-dense subopercular region beneath the operculum, as well as the absence of an apical button. Our results show that the acrosomal vesicle is spherical or elliptical, with concentric acrosomal zones, partially surrounded by the nucleus, and featuring radial arms. The acrosomal vesicle consists of four zones: internal, ray zone, external, and peripheral. The ultrastructural analyses presented in this study can broaden the understanding and fill existing gaps in the phylogenetic relationships among freshwater crab families, contributing to advancements in reproductive biology and providing insights for their conservation and preservation.

Keywords: ultrastructure, freshwater crabs, Pseudothelphusidae, reproductive biology

1 INTRODUÇÃO

Embora os caranguejos de água doce representem um dos mais diversos grupos dentro dos Brachyura, poucos estudos sobre a morfologia de seus espermatozoides e espermatóforos foram conduzidos (Brandis, 2000; Du et al., 1999; Guinot et al., 1997; Jamieson & Tudge, 2000; Tudge & Justine, 1994; Wang et al., 1999) e os espermatozóides e os espermatóforos do neotropical Pseudothelphusoidea e Trichodactylidae (Matos et al., 1996) ainda permanecem amplamente inexplorados. Nota-se que a maior parte dos estudos que tratam do SRM de braquiúros tem como foco representantes marinhos, e.g. Grapsoidea, Majoidea e Portunoidea. Já os estudos relacionados à caranguejos de água doce, comumente, enfocam a ultraestrutura do espermatozóide e possíveis relações filogenéticas entre grupos do Velho Mundo, sendo as superfamílias Gecarcinucoidea e Potamoidea bem exploradas (Guinot et al., 1997; Klaus & Brandis, 2011; Klaus et al., 2009; Klaus et al., 2013; Scalici et al., 2010).

Os espermatozoides de Brachyura são imóveis e aflagelados, com acrossoma ou vesícula acrossomal constituída por camadas concêntricas revestidas por uma membrana moderadamente eletrodensa, sendo centralmente penetrado pelo *perforatorium* ou tubo perfurador (Subramoniam, 1983; Tudge, 2009). A transferência de espermatozoides é realizada pelos gonópodos e pelo pênis, protegidos por um envelope protetor, o espermatóforo, durante a cópula (Krol et al., 1992). O esperma pode ser estocado em uma porção modificada do ducto genital, o receptáculo seminal (Krol et al., 1992), ou em uma invaginação do exoesqueleto, sem ligação com o ducto genital, a spermateca (Guinot & Quenette, 2005).

Na região central do acrossoma, encontra-se a câmara perforatorial, uma invaginação do citoplasma que apresenta ampla variação de forma (Jamieson & Tudge, 2000; Tudge, 2009). Essas regiões podem receber denominações específicas, as quais ajudam a caracterizar determinados grupos de crustáceos. Em geral, as zonas são classificadas como: zona

acrossomal interna, mediana, raiada e externa (Jamieson, 1994).

O núcleo possui cromatina esparsa e descondensada, com braços radiais formando projeções e, às vezes, contendo elementos do citoesqueleto (Jamieson & Tudge, 2000; Jamieson, 1994; Tudge et al., 2014; Tudge, 2009).

Os espermatozoides são enviados para o vaso deferente anterior (AVD), onde ocorre a formação do espermatóforo a partir de secreções liberadas pelas células epiteliais (Castilho et al., 2008; Nagao & Munehara, 2003; Tiseo et al., 2017; Zara et al., 2012). Os espermatozoides são empacotados no interior dos espermatóforos (Klaus et al., 2013; Tiseo et al., 2014; Zara et al., 2012). Esse mecanismo de empacotamento é descrito em vários grupos de decápodes, como Penaeoidea (Bauer & Cash, 1991), Astacidea (Erkan et al., 2009), Anomura (Tudge & Jamieson, 1991) e Brachyura (Guinot et al., 1997; Klaus et al., 2009; Tiseo et al., 2017). Sendo assim, o processo de empacotamento de células espermáticas em espermatóforos pode ocorrer de duas maneiras: cleistospermia (um único espermatozide por espermatóforo) e coenospermia (vários a muitos espermatozides por espermatóforo). Em Brachyura, a parede do espermatóforo pode ser formada por uma matriz extracelular homogênea (Klaus et al., 2009) ou apresentar de uma a sete camadas com diferentes composições e densidades eletrônicas (Tiseo et al., 2014; Tiseo et al., 2017).

Os caranguejos verdadeiros, representam um dos grupos mais diversos dentro os decápodes. Atualmente, são conhecidas mais de 7.683 espécies descritas, distribuídas em 107 famílias (De Grave et al., 2023). Entre estas, cinco famílias são exclusivamente encontradas em habitats de água doce: Gecarcinucidae, Potamonautidae, Potamidae, Pseudothelphusidae e Trichodactylidae. Essas famílias habitam regiões tropicais e subtropicais da América Central e do Sul, da África, de Madagascar, do sul da Europa, da Índia, da Ásia e da Austrália (Cumberlidge et al., 2009). Entre os caranguejos de água doce neotropicais, destacam-se os Pseudothelphusidae e Trichodactylidae. Essas duas famílias estão restritas ao continente

americano, sendo as únicas a ocorrerem no Brasil (Magalhães & Türkay, 1996a, 1996b, 1996c; Magalhães, 2003a, 2003b; Rodríguez, 1992).

A maioria das pesquisas existentes concentra-se em caranguejos de água doce do Velho Mundo, particularmente das superfamílias Gecarcinucoidea (Bandal et al., 2015; Klaus et al., 2009; Klaus et al., 2013) da Ásia e da África, e Potamoidea (Guinot et al., 1997; Klaus & Brandis, 2011; Scalici et al., 2010). Dessa forma, devido à escassez de estudos sobre caranguejos de água doce neotropicais, é essencial expandir as investigações sobre as famílias de caranguejos dessa região, a fim de preencher as lacunas no conhecimento científico sobre esses organismos e sua biologia reprodutiva.

Dentre as famílias de caranguejos de água doce no mundo, duas ocorrem no Brasil — Trichodactylidae e Pseudothelphusidae —, as pesquisas até o momento restringem-se à Trichodactylidae (Silva et al., 2012). Para a família Pseudothelphusidae, este trabalho é o pioneiro neste tipo de estudo.

Uma ferramenta que tem ganhado destaque no estudo da biologia reprodutiva dessas espécies é a análise da ultraestrutura dos espermatozoides, também conhecida como espermiotaxonomia. Esse método é importante para aprofundar a compreensão da taxonomia e das relações filogenéticas entre as espécies (Assugeni et al., 2017; Camargo et al., 2016; Camargo et al., 2017; Garcia Bento et al., 2018; Jamieson & Tudge, 2000; Tudge, 2009). Portanto, o presente trabalho descreve, pela primeira vez, a ultraestrutura dos espermatozoides e dos espermatóforos das espécies *Fredius ibiapaba*, *Kingsleya attenboroughi*, *Rodriguezus garmani*, *Kingsleya* sp. nov. e *Melothelphusa apiaka*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Animais

Cinco caranguejos machos foram coletados por captura direta em serrapilheira e em solo úmido de florestas de terra firme ou próximos a pequenos riachos. Em janeiro e novembro de 2015, machos de *R. garmani* em Isla Margarita, Venezuela (11°01'04" N, 63°55'20" W), *Kingsleya* sp. nov. na fazenda São Nicolau, de Cotriguaçu-MT (9° 51' 26.23" S/ 58° 14' 57 43 O) e *Melothelphusa apiaka* no Parque Estadual do Cristalino, situado entre os municípios de Alta Floresta e Novo Mundo (9° 33' 13.43" S/ 55° 42' 13.74" O), no extremo norte de Mato Grosso. Posteriormente, em novembro de 2021, representantes de *K. attenboroughi* e *F. ibiapaba* nos municípios de Barbalha (07°20'07.6" S, 39°23'58.8" W) e Ipu (04°17'42" S, 40°44'43" W), respectivamente, ambos localizados no estado do Ceará, Nordeste do Brasil (Figura 10). Após as coletas, os caranguejos foram devidamente transportados ao laboratório em caixas térmicas com aeração e mantidos por um curto período de tempo (24 horas) em aquários com fundos escuros (45 x 25 x 30 cm), contendo refúgios artificiais e sedimento argilo-siltoso e folhiço como substrato (temperatura 25 ± 0,5°C).

Seguindo a rotina descrita para as demais espécies nos laboratórios do LSZ - Laboratório de Sistemática Zoológica - Unesp/Instituto de Biociências de Botucatu (IBB) e IML - Laboratório de Morfologia de Invertebrados, Departamento de Biologia (DB), / Unesp - Jaboticabal, São Paulo.

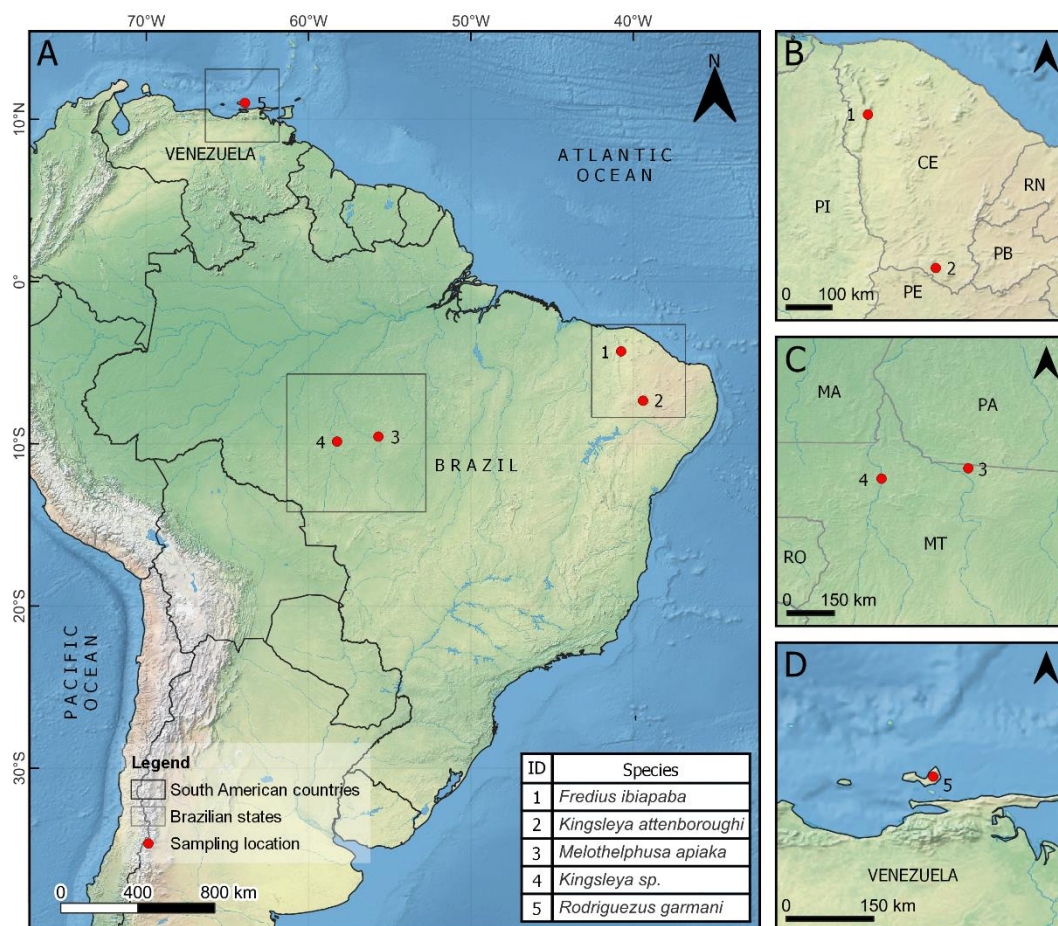


Figura 10. Localização das áreas de coleta de (1) *Fredius ibiapaba* (Santos et al., 2020), (2) *Kingsleya attenboroughi* (Pinheiro & Santana, 2016), (3) *Melothelphusa apiaka* (Pedraza et al., 2016), (4) *Kingsleya sp. nov.* (Ortmann, 1897) e (5) *Rodriguezus garmani* (Rathbun, 1898).

2.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Os animais coletados foram transportados vivos para o laboratório, anestesiados por resfriamento e dissecados. Amostras dos sistemas reprodutores masculinos (1 mm^3) foram submetidas à fixação em Karnovsky (glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2%) em tampão cacodilato de sódio (pH 7.4), contendo 5% de sacarose, por 4 horas (Ro et al., 1990). Posteriormente, as amostras foram submetidas a três banhos em tampão cacodilato de sódio M (pH 7.4), com duração de 10 minutos cada e, em seguida, pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% no mesmo tampão por duas horas. Após três lavagens de 10 minutos em tampão, as

amostras foram contrastadas “En Bloc” com acetato de uranila 1% (overnight, 4° C). A desidratação foi realizada em sequência ascendente de acetona (50 a 95%) e as amostras foram incluídas em resina Epon - Araldite. Os cortes semi e ultra-finos foram obtidos no ultramicrotomo Leica UC7 e as grades contrastadas em acetato de uranila e citrato de chumbo. As imagens foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM – 1010 do Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV, UNESP – Campus de Jaboticabal, operado à 80KV. A nomenclatura básica utilizada na classificação das estruturas espermáticas seguiu as propostas de Jamieson (1994) e Jamieson e Tudge (2000), enquanto para a morfologia da câmara perforatorial utilizou-se a taxonomia das espécies gregarinas propostas por Clopton (2004).

3 RESULTADOS

3.1 Morfologia geral dos espermatóforos e dos espermatozoides

Todas as espécies analisadas apresentam espermatóforos do tipo cleistospérmicos, caracterizados por um opérculo imperfurado. Abaixo do opérculo, a região subopercular exhibe menor densidade eletrônica. Os espermatozoides destas espécies não possuem botão apical, enquanto a vesícula acrossomal apresenta quatro camadas concêntricas com diferentes densidades eletrônicas. Essa estrutura é lateralmente circundada por um núcleo de formato variável. Além disso, observa-se a presença de uma zona acrossomal raiada, com a base da câmara perforatória rodeada por um anel espesso e bem desenvolvido. Os resultados mostram que a vesícula acrossomal é esférica ou elíptica com zonas acrossomais concêntricas, sendo a vesícula acrossomal parcialmente envolvida pelo núcleo, e braços radiais. A vesícula acrossomal é formada por quatro zonas: interna, zona acrossomal raiada, externa e periférica. Em geral, o opérculo é localizado no polo anterior ou apical. Na região subopercular, encontra-se o anel opercular acessório. Os cortes transversais confirmam a morfologia observada em cortes longitudinais, com a presença da câmara perforatorial central e as zonas acrossomais.

Fredius ibiapaba

O espermatóforo de *F. ibiapaba* apresenta formato esférico, envolto por dois tipos de secreção: S1 eletrodensa e S2 eletrolúcida (Figura 11 A).

O espermatozóide apresenta um núcleo que se posiciona lateralmente à vesícula acrossomal, notando-se a presença de pequenos braços radiais. O corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial mostra que o espermatozoide é formado pela câmara perforatorial,

vesícula acrossomal, opérculo e núcleo com braços radiais (Figura 11 B). Note a presença de uma membrana eletrodensa (seta branca) (Figura 11 C).

O espermatozoide de *F. ibiapaba* exibe núcleo amplo com cromatina fibrosa. O opérculo é imperfurado apresentando forma triangular (Figura 11 D). Ao redor da margem do opérculo está a aba periopercular e junto a ela nota-se a cápsula percorrendo em sentido posterior ou basal. Abaixo do opérculo, encontra-se o material subopercular (Figura 11 E), que é menos eletrodense. Na margem da região subopercular, encontra-se o curto anel opercular acessório (Figura 11 F) e uma aba periopercular.

A vesícula acrossomal apresenta forma esférica ou elíptica e é formada por quatro camadas: interna, raiada, externa e periférica. A zona acrossomal interna, mais eletrodensa que as demais zonas, inicia-se na base do perforatório e vai até a sua metade. A zona acrossomal raiada é eletrolúcida e a externa é eletrodensa - ambas se iniciam na base do perforatório e vão até a zona subopercular -, a zona acrossomal periférica eletrolúcida se inicia no anel espessado e vai até a cápsula (Figura 11 G). Na base da câmara perforatorial, encontra-se o anel espessado eletrodense em contato com o material eletrolúcido da cápsula, a qual termina na margem anterior do anel espessado (Figura 11 H). Os cortes transversais confirmam a morfologia observada em cortes longitudinais, com a presença da câmara perforatorial central e as zonas acrossomais (Figura 11 I, J).

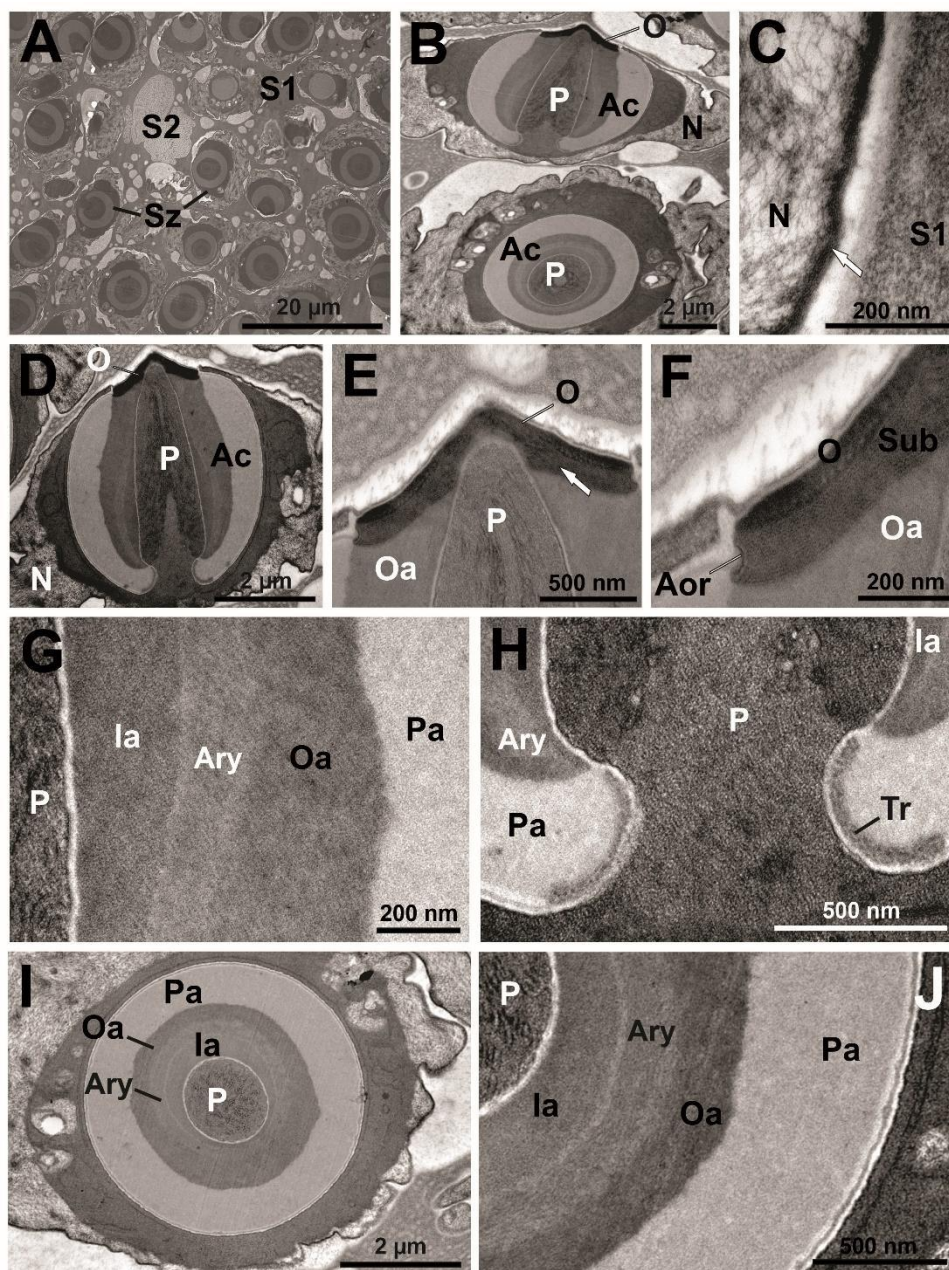


Figura 11. Ultraestrutura dos espermatóforos e dos espermatozóides de *Fredius ibiapaba*. **A.** vaso deferente contendo espermatóforos celsitospérmicos imersos em dois tipos de S1, secreção eletrodensa e S2 elétronlúcida. **B.** corte longitudinal da câmara perforatorial mostra o espermatozóide formado pela câmara perforatorial e vesícula acrossomal, composta por quatro camadas com o opérculo imperfurado eletrodensa. **C.** parede do espermatóforo (seta branca). **D.** câmara perforatorial envolta pela vesícula acrossomal apresentando zonas concêntricas com diferentes eletrodensidades. **E.** abaixo do opérculo, a região subopercular eletrolúcida (seta branca). **F.** observe a região subopercular e o anel opercular acessório. **G.** vesícula acrossomal constituída por quatro camadas concêntricas. **H.** detalhe da base do acrossoma mostrando o anel espessado. **I-J.** Em corte transversal as quatro camadas da vesícula acrossomal e a câmara

perforatorial. S1: Secreção 1; S2: Secreção 02; Sz: Espermatozóide; O: Opérculo; P: Câmara Perforatorial; Ac: Vesícula acrossomal; N: Núcleo; Ia: Zona acrossomal interna; Oa: Zona acrossomal externa; Aor: Anel opercular acessório; Sub: Região subopercular; Ary: zona acrossomal raiada; Pa: Zona acrossomal periférica; Tr:- Anel espessado.

Kingsleya attenboroughi

O espermatóforo de *K. attenboroughi* apresenta formato esférico, envolto por dois tipos de secreção: S1 eletrodensa e S2 eletrolúcida (Figura 12 A). O espermatozóide apresenta um núcleo que se posiciona lateralmente à vesícula acrossomal, notando-se a presença de pequenos braços radiais. A membrana eletrodensa posiciona-se junto ao opérculo imperfurado (Figura 12 B). O corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial mostra que o espermatozoide é formado por opérculo imperfurado, câmara perforatorial, vesícula acrossomal e núcleo com braços radiais (Figura 12 C). Região subopercular e logo abaixo a zona acrossomal interna (seta preta); note-se a zona acrossomal externa no ápice, pois não se observa a zona acrossomal raiada (Figura 12 D).

A vesícula acrossomal apresenta morfologia esférica ou elíptica. O opérculo é imperfurado e o botão apical apresenta forma triangular. Abaixo do opérculo, o material subopercular é menos eletrodensa, onde se localiza um curto anel opercular acessório e ausência da aba periopercular, como a encontrada em *F. ibiapaba*.

A zona acrossomal externa está em contato direto com a zona acrossomal periférica. (Figura 12 E). Na base da vesícula acrossomal, observa-se a zona acrossomal interna, a externa e a periférica; note a presença de invaginações da membrana (cabeça de seta branca) (Figura 12 F). Observe-se o anel espessado no final da zona acrossomal periférica (Figura 12 G). O corte transversal próximo à região intermediária do acrossomo mostra a câmara perforatorial, a zona acrossomal interna, a zona acrossomal externa e a periférica (Figura 12 H). O corte

longitudinal mostra as quatro zonas da vesícula acrossomal, observe a zona acrossomal raiada (Figura 12 I).

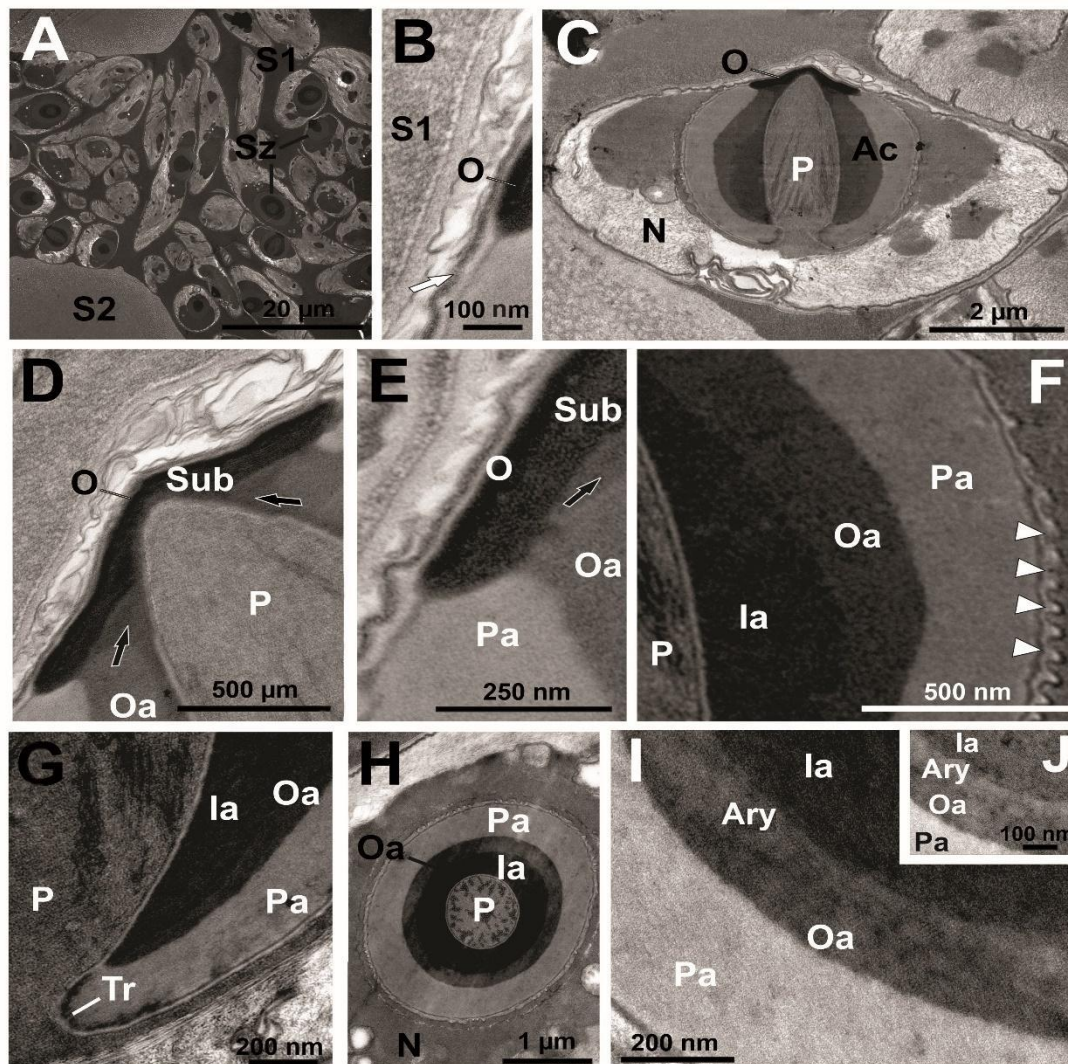


Figura 12. Ultraestrutura dos espermatóforos e dos espermatozóides de *Kingsleya attenboroughi*. **A.** observe espermatóforos cleistospérmicos imersos em dois tipos de S1, secreção eletrodensa e S2 elétrolúcida. **B.** opérculo eletrodensa em contato com a cápsula e zona acrossomal periférica, região subopercular em contato a zona opercular externa. **C.** eixo da câmara perforatorial mostra o espermatozóide, formado pela câmara perforatorial, vesícula acrossomal com opérculo imperfurado. **D.** detalhe da zona subopercular em contato com a zona acrossomal interna (seta preta). **E.** observe a zona acrossomal interna (seta preta) em contato com a região subopercular. **F.** próximo ao ápice da vesícula acrossomal, observam-se as zonas acrossomais interna, externa e periférica. **G.** detalhe da curta base da câmara perforatorial, exibindo o anel espessado eletrodensa e as zonas acrossomais interna, externa e periférica. **H-**

I. próximo à base da vesícula acrossomal observe as quatro camadas da vesícula acrossomal com diferentes elerondensidades. Ac: Vesícula acrossomal; Ia: Zona acrossomal interna; Ary: zona acrossomal raiada; N: Núcleo; O: Opérculo; Ao: Zona acrossomal externa; P: Câmara perforatorial; Sub: Região subopercular; Tr: Anel espessado.

Rodriguezus garmani

O espermatóforo de *Rodriguezus garmani* apresenta formato esférico e é envolto por dois tipos de secreção S1 eletrodensa e S2 eletrolúcida (Figura 13 A). A membrana eletrodensa posiciona-se junto ao opérculo eletrodenso na região apical (Figura 13 B).

O corte longitudinal ao longo do maior eixo da câmara perfuratória revela que o espermatozoide é composto por diversas estruturas bem definidas: a câmara perfuratória, a vesícula acrossomal, o opérculo imperfurado e o núcleo com braços radiais, que envolve toda a vesícula acrossomal. Esta última apresenta formato elipsoidal e está localizada na região central, sendo preenchida internamente pela câmara perfuratória (Figura 13 C).

Detalhes do ápice acrossomal mostram um opérculo eletrodenso imperfurado e, abaixo dele, a região subopercular contendo um anel opercular acessório (Figuras 13 D, E). Esse anel opercular acessório termina na zona acrossomal periférica, que é seguida pela zona acrossomal raiada (Figura 13F).

Na base da câmara perfuratória, observa-se um anel espesso em contato com as zonas acrossomais interna, intermediária e periférica (Figura 13 G). Próximo à base do opérculo, junto ao anel espesso, é possível identificar a zona acrossomal interna (Figuras 13 H, I). Em cortes transversais próximos à câmara perfuratória são claramente visíveis as zonas acrossomais interna, externa e periférica (Figura 13 J).

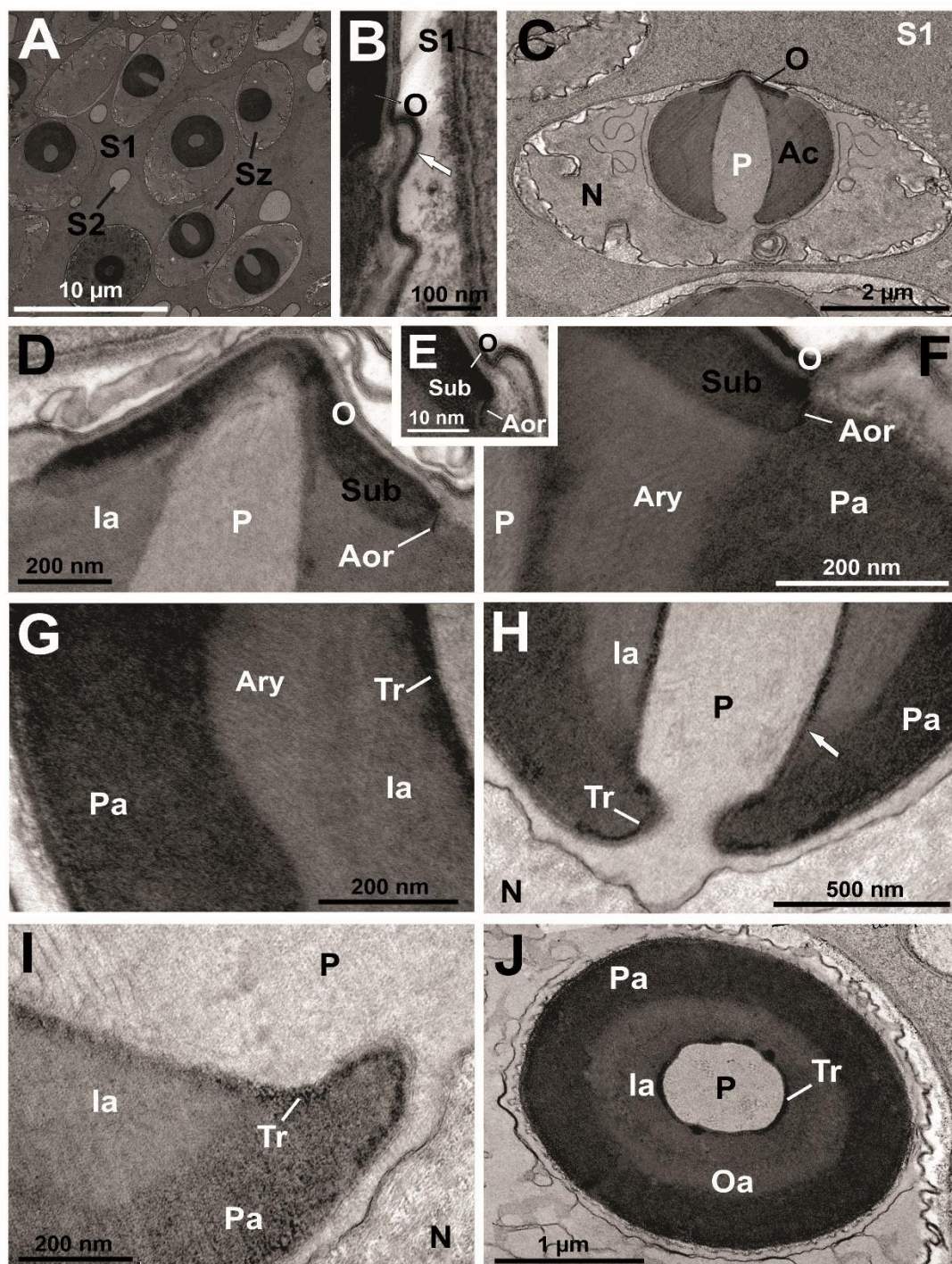


Figura 13. Ultraestrutura dos espermatóforos e dos espermatozóides de *Rodriguezus garmani*. **A.** vaso deferente contendo espermatóforos cleistospérmicos imersos em dois tipos de S1 eletrodensa e S2 elétrólucida. **B.** observe o opérculo eletrodensa e a parede do espermatóforo (seta branca) e a secreção S1. **C.** corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial. Nota-se espermatozoide constituído pela vesícula acrossomal, câmara perforatorial, opérculo imperfurado e núcleo, com a presença dos braços radiais. **D.** corte longitudinal mostrando opérculo eletrodensa e região subopercular com anel opercular acessório. **E- F.** Detalhe do anel

opercular acessório em contato com a zona acrossomal periférica e a zona acrossomal raiada, que termina na região subopercular. **G-H-I.** Detalhe exibindo o anel espessado envolvido em contato com a zona acrossomal interna e periférica. **J.** Corte transversal, anel espessado floculado, zona acrossomal interna, externa e periférica, não aparecendo a zona acrossomal raiada. Ac: Vesícula acrossomal; Ia: Zona acrossomal interna; N: Núcleo; O: Opérculo; Ao: Zona acrossomal externa; P: Câmara perforatorial; Ary: zona acrossomal raiada; Sub: Região subopercular; Tr: Anel espessado, Aor: Anel opercular acessório.

Kingsleya sp.

O espermatóforo de *Kingsleya* sp é do tipo cleistospérmico com formato irregular ou elipsoidal, envolto por dois tipos de secreção: S1 eletrodensa e S2 eletrolúcida, com citoplasma abundante (Figura 14 A).

Em corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial nota-se que o espermatozoide é constituído por vesícula acrossomal, câmara perforatorial, opérculo imperfurado e núcleo, com a presença dos braços radiais (Figura 14 B). É possível observar uma membrana eletrodensa envolvendo o ápice do perforatório (seta preta), a zona acrossomal intermediária está em contato direto com o perforatório e a zona acrossomal periférica (Figura 14 C, D, E). Note a base da vesícula acrossomal e o anel espessado floculado com citoplasma abundante ao seu redor. Observe apenas a zona acrossomal interna e a periférica (Figura 14 F, G). Também é possível observar acima da base do perforatório as zonas acrossomais interna, raiada, externa e periférica (Figura 14 H). Em corte transversal, verificam-se as quatro camadas da vesícula acrossomal envolvendo o perforatório (Figura 14 I, J).

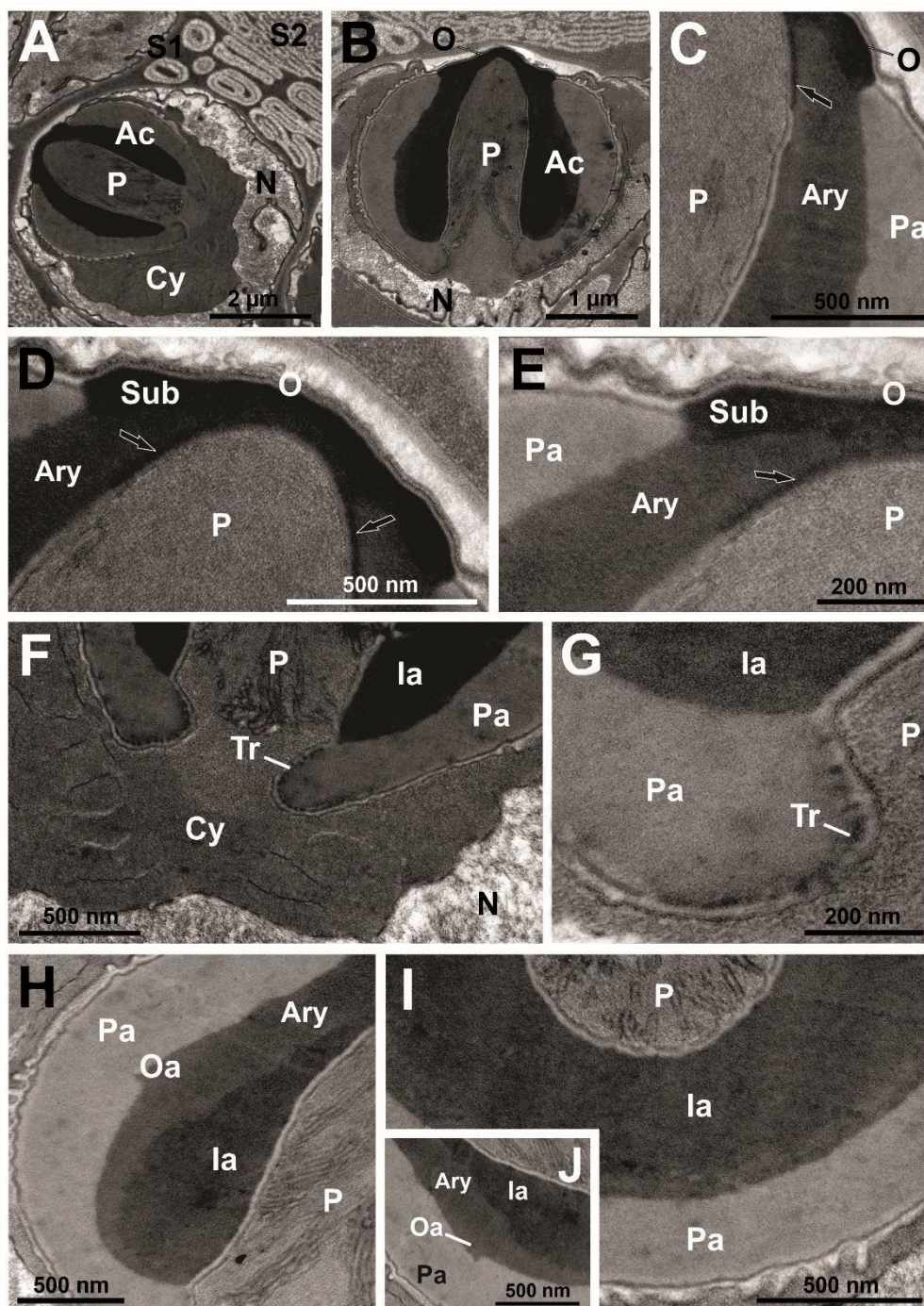


Figura 14. Ultraestrutura dos espermatóforos e dos espermatozóides de *Kingsleya* sp. **A.** espermatóforos cleistospérmicos imersos em dois tipos de S1 elétrondesa e S2 eletrolúcida, com citoplasma volumoso na base. **B.** espermatozoide constituído pela vesícula acrossomal, câmara perforatorial, opérculo imperfurado e núcleo. **C.** detalhe do opérculo eletrodensa e da camada eletrodensa na região apical do perforatório (seta preta). **D.** opérculo eletrodensa imperfurado, note zona opercular intermediária em contato com a região subopercular (seta preta). **E.** câmara perforatorial circundada pela zona acrossomal raiada e periférica. **F-G.** detalhe da base do acrossoma mostrando o anel espessado, imerso em um citoplasma

eletrodenso. **H.** na base do acrossoma observam-se as quatro camadas da vesícula acrossomal. **I.** corte transversal próximo à região intermediária do acrossomo mostrando a câmara perforatorial, zona acrossomal interna e periférica. **J.** corte transversal na base do acossoma e as quatro zonas acrossomais. Ac: Vesícula acrossomal; Ia: Zona acrossomal interna; Ary: zona acrossomal raiada; N: Núcleo; O: Opérculo; Ao: Zona acrossomal externa; P: Câmara perforatorial; Sub: Região subopercular; Tr: Anel espessado.

Melothepphusa apiaka

O espermatóforo de *M. apiaka* apresenta formato elipsoidal, envolto por dois tipos de secreção, S1 eletrodensa e S2 eletrolúcida. Observe citoplasma posicionando-se na região lateral da vesícula acrossomal (Figura 15 A). Em corte longitudinal sob o maior eixo da câmara perforatorial nota-se que o espermatozoide é constituído pela vesícula acrossomal, câmara perforatorial, opérculo imperfurado e núcleo, com a presença dos braços radiais, e uma grande quantidade de S2 secreção elétronlúcida (Figura 15 B). Na região apical, observa-se uma membrana eletrolúcida (seta branca), o opérculo eletrodenso e a região subopercular em contato com a zona acrossomal raiada e o perforatório (Figura 15 C). Detalhe do ápice acrossomal, exibindo opérculo eletrodenso imperfurado, membrana eletrodensa na região apical do perforatório (seta preta), zona acrossomal raiada e zona acrossomal periférica (Figura 15 D, E).

Observa-se, na região medial da vesícula acrossomal, a presença da vesícula acrossomal interna, da raiada e da periférica (Figura 15 F,G). Detalhe do corte longitudinal próximo à base do acrossomo exibindo o anel espessado que envolve a base da câmara perforatorial. Nota-se, ainda, as zonas acrossomais interna, raiada e periférica (Figura 15 H, I). Detalhe do corte transversal, nota-se também as zonas acrossomais interna, raiada, externa e periférica (Figura 15 J, K).

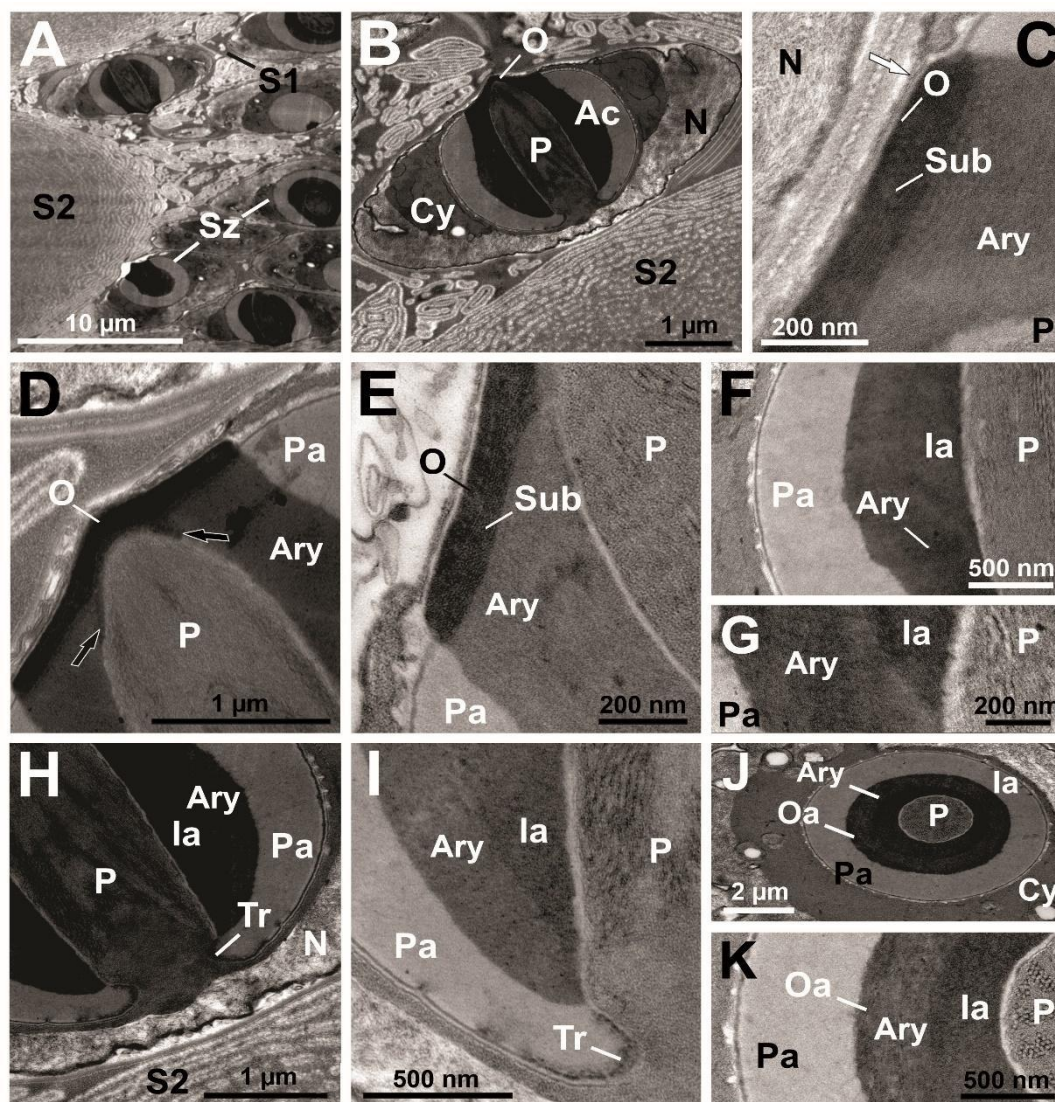


Figura 15. Ultraestrutura dos espermatóforos e dos espermatozóides de *M. apiaka* **A.** Note espermatóforos cleistospérmicos imersos em dois tipos de S1 elétródensa e S2 eletrolúcida. **B.** câmara perforatorial com espermatozóide constituído pela vesícula acrossomal, câmara perforatorial, opérculo imperfurado e núcleo, presença dos braços radiais e citoplasma volumoso. **C.** observe o opérculo eletrodensa. **D.** detalhe do ápice acrossomal, exibindo opérculo eletrodensa e imperfurado, região subopercular (setas pretas). **E.** opérculo e região subopercular em contato com a zona acrossomal raiada e com a periférica. **F-G** câmara perforatorial circundada pela vesícula acrossomal; **H-I** base do acrossoma mostrando anel espessado, seguido pelas zonas acrossomais interna, raiada e externa. **J-K.** câmara perforatorial, zona acrossomal interna, zona acrossomal raiada, externa e periférica. Ac: Vesícula acrossomal; Ia: Zona acrossomal interna; Ary: Zona acrossomal raiada; N: Núcleo; O: Opérculo; Ao: Zona acrossomal externa; P: Câmara perforatorial; Sub: Região subopercular; Tr: Anel espessado.

Caracterização geral dos espermatóforos e espermatozoides de *Fredius ibiapaba*, *Kingsleya attenboroughi*, *Kingsleya* sp. nov., *Rodriguezus garmani* e *Melothelphusa apiaka* (Figura 16) apresentam uma morfologia típica de vários representantes da infraordem Brachyura

Figura 16. Características ultraestruturais de espermatóforos e espermatozoides observadas em *Fredius ibiapaba*, *Kingsleya attenboroughi*, *Rodriguezus garmani*, *Kingsleya* sp. nov. e *Melothelpusa apiaka*

Características/Espécies	<i>Fredius ibiapaba</i>	<i>Kingsleya attenboroughi</i>	<i>Rodriguezus garmani</i>	<i>Kingsleya</i> sp. nov.	<i>Melothelpusa apiaka</i> .
Espermatóforo Espermatozoide Tipo Morfologia	Cleistospérmicos Elíptica	Cleistospérmicos Elíptica	Cleistospérmicos Elíptica	Cleistospérmicos Esférica	Cleistospérmicos Elíptica
Vesícula Acrossomal Região subopercular Anel espessado Zona acrossomal raiada	Quatro camadas concêntricas Presente Presente Presente	Quatro camadas concêntricas Presente Presente Presente	Quatro camadas concêntricas Presente Presente Presente	Quatro camadas concêntricas Presente Presente Presente	Quatro camadas concêntricas Presente Presente Presente
Opérculo Tipo Anel Opercular Acessório	Imperfurado eletrodenso Presente	Imperfurado eletrodenso Ausente	Imperfurado eletrodenso Presente	Imperfurado eletrodenso Ausente	Imperfurado eletrodenso Ausente
Câmara Perforatorial Botão pical Forma Forma do apice Ondulações da parede Braços laterais	Ausente Oblongada Romboide Ausente Presente	Ausente Oblongada Romboide Ausente Presente	Ausente Oblongada Romboide Ausente Presente	Ausente Oblongada Romboide Ausente Presente	Ausente Oblongada Romboide Ausente Presente

A terminologia para a morfologia dos espermatozoides está de acordo com Guinot et al. (1997), Jamieson (1994), Klaus et al. (2009), Tiseo et al. (2017) e Tudge et al. (2014).

3.2 Discussão

Os espermatóforos de *Fredius ibiapaba*, *Kingsleya attenboroughi*, *Rodriguezus garmani*, *Kingsleya* sp. nov. e *Melothelphusa apiaka* são do tipo cleistospérmicos, o mais comum em caranguejos de água doce, como demonstrado para Potamidae, Potamonautidae (Guinot et al., 1997; Jamieson, 1993; Klaus et al., 2009) e Gecarcinucidae (Klaus & Brandis, 2011; Klaus et al., 2009). Estes espermatóforos apresentam parede eletrodensa, imersos em um fluido seminal composto por dois tipos de secreção, S1 eletrodensa e S2 eletrolúcida. Esta parede e o fluido seminal fornecem proteção aos espermatozóides, principalmente durante a transferência espermática, podendo estar envolvidos em diferentes estratégias de deiscência e fertilização nos animais (Subramoniam, 1991).

Os espermatozóides das cinco espécies estudadas compartilham características gerais típicas para o Eubrachyura (Jamieson, 1994), mas especialmente para os das famílias de caranguejos de água doce Potamonautidae, Potamidae (Guinot et al., 1997; Jamieson et al., 1993; Klaus et al., 2009) e Gecarcinucidae (Klaus & Brandis, 2011; Klaus et al., 2009), conhecidos como os do Velho Mundo.

Essas características incluem a presença de espermatozóides com vesícula acrossomal, formada por quatro zonas acrossomais concêntricas, anel espessado eletrodenso, núcleo com a presença dos braços radiais e ausência de placa nucleocitoplasmática. Observamos ainda semelhanças importantes na ocorrência de alguns caracteres espermáticos, como a presença de um opérculo contínuo, sem perfuração central, observado em *U. cordatus*. Este padrão opercular é encontrado em Macrophthalmidae Dana, 1851 e *Macrophthalmus* (macrophthalmus) *crassipes* H. Milne Edwards, 1852 (Jamieson, 1991; Jamieson, 1994) e também com um único representante de Ocypodidae, *L. thayeri* (Benetti et al., 2008).

Em *F. ibiapaba* e *R. garmani* foi observado o anel opercular acessório nas margens

laterais do anel subopercular, vista na secção longitudinal do espermatozóide, também encontrada em *Calocarcinus africanus* Calman (1909), um anel acessório látero-posterior à zona subopercular, ocorrendo em xantídeos, por exemplo, *Étius laevimanus*, *Pilodius areolatus* (Jamieson et al., 1993), caranguejos do Velho Mundo. Em todas as espécies estudadas, encontramos a zona acrossomal raiada, que ocorre em heterotremados, como xantídeos e portunídeos (Jamieson & Tudge, 1990; Jamieson, 1989). A zona acrossomal raiada é muito claramente desenvolvida no cenobitídeo paguroide *Birgus latro* (Tudge & Jamieson 1991). Dentro do Brachyura, apenas os heterotremados mostram uma zona de raios acrossômicos comparável em localização e estrutura com a de anomuranos (Jamieson, 1994).

Quando comparamos os espermatóforos e os espermatozóides de caranguejos de água doce da família Trichodactylidae, como nas espécies *Dilocarcinus pagei* (H. Milne-Edwards, 1837), *Zilchiopsis oronensis* (Rodrigues & Fransen, 2004) e *Valdivia serrata* (Rodrigues & González, 1999) (De Oliveira et al., 2021), observa-se a ausência da zona acrossomal raiada. Essa característica também foi relatada em *Dilocarcinus septemdentatus* (Matos et al., 1996) e é comum em espermatozóides de caranguejos de água doce das famílias do Velho Mundo, bem como na família Pseudothelphusidae, investigada neste estudo.

Por outro lado, todas as espécies analisadas nesta pesquisa apresentaram a zona acrossomal raiada, incluindo uma zona acrossomal externa e periférica. Essa estrutura é similar à encontrada em Xanthidae (Jamieson, 1989; Jamieson, 1991; Jamieson et al., 1993) e em *Calocarcinus africanus* (Jamieson et al., 1993). Destaca-se, ainda, que nas espécies *D. pagei*, *Z. oronensis* e *V. serrata* (De Oliveira et al., 2021), a vesícula acrossomal apresenta uma morfologia globular composta por três camadas concêntricas de diferentes densidades eletrônicas, semelhante à observada em outros representantes de Brachyura, como espécies de diversas famílias de majoides (Assugeni et al., 2017; Tudge et al., 2014).

Além disso, as espécies *Fredius ibiapaba*, *Kingsleya attenboroughi*, *Rodriguezus*

garmani, *Kingsleya* sp. nov. e *Brasiliotelphusa* sp. nov. possuem vesículas acrossomais com quatro camadas concêntricas de densidades distintas. Uma estrutura conhecida como anel espessado, caracterizada como uma lâmina curta e curva aderida à superfície interna da cápsula acrossomal, onde esta se invagina para formar a câmara subacrossomal, está presente em todas as espécies analisadas neste estudo. Essa estrutura é típica de heterotremados e toracotremados, embora seja reduzida em *Potamonautes* (Nobili, 1906) e ausente em toracotremados (Jamieson, 1991; Jamieson, 1993). A morfologia da câmara perfuratória em Pseudothelphusidae mostra semelhanças com Potamonautidae, Potamidae e Gecarcinucidae, que ocorrem em outros caranguejos de água doce descritos (Guinot et al., 1997; Jamieson et al., 1993; Klaus & Brandis, 2011; Klaus et al., 2009). A concavidade ou o truncamento estreito da base da vesícula acrossômica, sob o anel espesso, é uma característica que distingue as espécies da família Pseudothelphuidae de Trichodactylidae. Esse estreitamento é observado em outros heterotremados, incluindo Potamonautidae, Potamidae e Gecarcinucidae (Guinot et al., 1997; Jamieson & Tudge, 2000; Klaus & Brandis, 2011; Klaus et al., 2009). O truncamento ao longo da largura do acrossoma na base da vesícula parece ser um importante caráter a ser considerado em futuros estudos da morfologia dos espermatozóides de outros gêneros desta família. Nos Pseudothelphusidae aqui investigados, os espermatozoides não apresentam uma placa nucleocitoplasmática, contrapondo-se à encontrada em *D. pagei*.

Mesmo que os espermatóforos em Pseudothelphusidae sejam cleistospérmicos, estes apresentam uma parede delgada, a qual também ocorre nos trichodactídeos, em que a parede (pellicle) é mais espessa (De Oliveira et al., 2021).

O mesmo padrão de espécies com cleistospermia e coenospermia também ocorre na família Potamidae (Klaus et al., 2009). Apesar de Guinot et al. (1997) terem proposto a cleistospermia como uma apomorfia que unia Potamidae e Potamonautidae, ficou claro que o tipo de espermatóforo é variado em Potamidae, porém, sempre com parede complexa, com

várias camadas de diferentes eletrodensidades, o que não ocorre nas espécies aqui descritas e em outras no Novo Mundo (De Oliveira et al., 2021). Para Potamonautidae e Dickeniidae somente uma espécie em cada família, sendo ambas cleistospérmicas e, segundo as filogenias mais atuais, especulamos que este é um caráter sinapomórfico encontrado neste grupo irmão, sendo a presença de espécies com os dois tipos de espermatóforos compartilhados pelo outro clado com Potamidae e Gecarcinucidae.

Mostramos a ultraestrutura dos espermatozoides de cinco espécies e quatro gêneros em Pseudothelphuidae. As características morfológicas observadas podem ser usadas como uma ferramenta sistemática, além de dados moleculares futuros, para hipóteses filogenéticas e relações dentro dos pseudotelfusídeos, semelhantes aos trabalhos realizados com outros caranguejos e camarões (Assugeni et al., 2017; Camargo et al., 2016; Camargo et al., 2017; Garcia Bento et al., 2018; Tudge et al., 2014).

3.3 Conclusão

Embora a morfologia dos espermatozoides de Pseudothelphusidae compartilhe características semelhantes com outras famílias de caranguejos de água doce, essa semelhança poderia sugerir a possibilidade de unir todas as famílias de caranguejos de água doce heterotremados em um único grupo. No entanto, as autapomorfias identificadas neste estudo, como a presença da zona acrossomal raiada, do opérculo imperfurado, de quatro zonas acrossomais concêntricas e o truncamento estreito na base da vesícula acrossomal, diferem das características exclusivas observadas na família Trichodactylidae, que incluem a ausência da zona acrossomal raiada, a borda periopercular e o anel espessado reduzido ou ausente.

Estas diferenças morfológicas fornecem evidências que sustentam a hipótese de que os pseudotelfusídeos estão mais proximamente relacionados aos caranguejos de água doce do

Velho Mundo. Este resultado corrobora os achados de Tsang et al. (2014), que sugerem uma linhagem independente para os caranguejos de água doce, reforçando a separação filogenética entre Pseudothelphusidae e Trichodactylidae.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que o sistema reprodutor masculino das espécies de Pseudothelphusidae analisadas apresenta uma estrutura tubular simples, sem a presença de glândulas acessórias, característica que contrasta com a família Trichodactylidae. A ausência destas glândulas e a morfologia particular dos espermatóforos e espermatozoides dos pseudothelphusídeos sugerem que esta família de caranguejos de água doce Neotropicais seguiu um caminho evolutivo distinto, reforçando a hipótese de uma separação filogenética precoce em relação às famílias do Velho Mundo.

A análise dos padrões morfológicos e ultraestruturais do sistema reprodutor masculino corrobora a hipótese de que os caranguejos de água doce neotropicais da família Pseudothelphusidae colonizaram os ambientes continentais em múltiplos eventos de transição a partir de ancestrais marinhos. Estudos filogenéticos anteriores sugerem que essa transição ocorreu de forma independente em diferentes linhagens de braquiúros, resultando em adaptações específicas ao ambiente dulcícola, como a evolução de sistemas reprodutores simplificados e mecanismos de retenção de espermatozoides adaptados a ambientes de baixa salinidade. As diferenças estruturais observadas entre Pseudothelphusidae e Trichodactylidae, tais como o formato do testículo e a composição do fluido seminal, reforçam a hipótese de que esses grupos representam eventos evolutivos distintos de colonização das águas continentais da América do Sul.

A ultraestrutura detalhada dos espermatozoides revelou características morfológicas únicas, como a presença da zona acrossomal raiada, do opérculo imperfurado e das quatro zonas acrossomais concêntricas, elementos que oferecem informações valiosas para a taxonomia e a sistemática do grupo. Esses dados não apenas contribuem para o entendimento

das relações evolutivas dentro de Pseudothelphusidae, mas também demonstram a importância da caracterização morfológica na compreensão da biodiversidade dos caranguejos dulcícolas.

Além disso, este estudo fornece uma base robusta para futuras investigações sobre os aspectos reprodutivos deste grupo, especialmente em um cenário de crescentes mudanças ambientais e pressões antrópicas sobre os habitats aquáticos. A identificação de padrões ultraestruturais específicos poderá auxiliar na formulação de estratégias de conservação e manejo das espécies, visando à preservação da diversidade genética e à sustentabilidade dos ecossistemas onde esses caranguejos estão inseridos.

Por fim, a continuidade das pesquisas, aliando análises morfológicas e moleculares, será essencial para esclarecer as relações filogenéticas entre os caranguejos de água doce, permitindo uma compreensão mais abrangente sobre sua evolução e adaptação a diferentes ambientes.

REFERÊNCIAS

- Albertoni, E. F., & Silva, C. P. (2010). Caracterização e importância dos invertebrados de águas continentais com ênfase nos ambientes de Rio Grande. *Cadernos de Ecologia Aquática*, 5(1), 9-27.
- Alberts, B., Bray, D., & Lewis, J. (2018). *Fundamentals of molecular biology of the cell*. New York, WW Norton & Company.
- Almeida, P. R. de S. (2016). Biologia reprodutiva do caranguejo *Goyazana castelnaui* H. Milne-Edwards, 1853 (Crustacea: Trichodactylidae) no semiárido pernambucano [Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural de Pernambuco]. Biblioteca de Teses e Dissertações da UFRPE.
<http://www.tede2.ufrpe.br:8080/tede/bitstream/tede2/7097/2/Paulo%20Rogerio%20de%20Souza%20Almeida.pdf>
- Almeida, P. R., Da Silva, L. N., & Shinozaki-Mendes, R. A. (2019). Reproductive biology of the freshwater crab *Goyazana castelnaui* (Brachyura: Trichodactylidae) in a semiarid region of Brazil. *Invertebrate Reproduction & Development*, 64(1), 1-9.
<https://doi.org/10.1080/07924259.2019.1655104>
- Álvarez, F., Ojeda, J. C., Souza-Carvalho, E., Villalobos, J. L., Magalhães, C., Wehrtmann, I. S., & Mantelatto, F. L. (2020). Revision of the higher taxonomy of Neotropical freshwater crabs of the family Pseudothelphusidae, based on multigene and morphological analyses. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 193(3), 973-1001.
<https://doi.org/10.1093/zoolinnea/zlaa162>
- Andrioli, G. C., Paschoal, L. R. P., Davanso, T. M., Costa, R. C., & Zara, F. J. (2024). Does morphological maturity anticipate physiological maturity? The pattern of sexual maturity in males of the seabob shrimp *Xiphopenaeus kroyeri* (Heller, 1862). *Regional Studies in*

- Marine Science, 73, 103489. <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2024.103489>
- Antunes, M., Zara, F. J., López-Greco, L. S., & Negreiros-Fransozo, M. L. (2016). Morphological analysis of the female reproductive system of *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura: inachoididae) and comparisons with other Majoidea. *Invertebrate Biology*, 135(2), 75–86. <https://doi.org/10.1111/ivb.12118>
- Antunes, M., Zara, F. J., López-Greco, L. S., & Negreiros-Fransozo, M. L. (2018). Male reproductive system of the arrow crab *Stenorhynchus seticornis* (Inachoididae). *Invertebrate Biology*, 137(2), 171–184. <https://doi.org/10.1111/ivb.12214>
- Araújo, J. G., Nascimento, W. M., Martins, C. A., Nobre, P. H., & Pinheiro, A. P. (2022). An observational record of *Kingsleya attenboroughi* Pinheiro & Santana, 2016 (Decapoda, Pseudothelphusidae), an endemic species from the Chapada do Araripe, southern Ceará, Brazil. *Check List*, 18(2), 363-367.
- Araújo, F. S., Rodal, M. J. N., Barbosa, M. R. V., Thomas, W. W., & Alves, M. V. (2020). Flora of Ceará State, Brazil: Caryocaraceae, Hypericaceae, and Rhizophoraceae. *Rodriguésia*, 71, e02432019.
- Assugeni, C. D. O., Magalhães, T., Bolaños, J. A., Tudge, C. C., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2017). Ultrastructure of spermatozoa of spider crabs, Family Mithracidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura): Integrative analyses based on morphological and molecular data. *Journal of Morphology*, 278, 1628-1646. <https://doi.org/10.1002/jmor.20737>
- Assugeni, C. D. O., Toyama, M. H., & Zara, F. J. (2021). From sperm plug formation to ovulation: morphological and ultrastructural modifications in the seminal receptacle of the blue crab *Callinectes danae*. *Zoologischer Anzeiger*, 291, 45-60. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2021.02.002>
- Bandral, M., Gupta, K., & Langer, S. (2015). Gonadal development in *Maydelliathelphusa*

- masoniana* (Henderson) using macro and microscopic techniques from Gho Manhasan stream of J&K State, India. *International Journal of Recent Scientific Research*, 6, 7215–7220.
- Batoy, C. B., Sarmago, J. F., & Pilai, B. C. (1989). Breeding season, sexual maturity and fecundity of the blue crab *Portunus pelagicus* (L.) in selected coastal waters in Leyte and Vicinity, Phillipines. *Annals of Tropical Research*, 9, 157-177.
- Bauer, R. T., & Cash, C. E. (1991). Spermatophore structure and anatomy of the ejaculatory duct in *Penaeus setiferus*, *P. duorarum*, and *P. aztecus* (Crustacea: Decapoda): homologies and functional significance. *Transactions of the American Microscopical Society*, 110(2), 144–162. 10.2307/3226751.
- Bauer, R. T. (2013). *The Biology of Decapod Crustacean Reproduction*. CRC Press.
- Benetti, A. S., Santos, D. C., Negreiros-Fransozo, M. L., & Scelzo, M. A. (2008). Spermatozoal ultrastructure in three species of the genus *Ua* Leach, 1814 (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Micron*, 39(3), 337-343.
<https://doi.org/10.1016/j.micron.2007.04.004>
- Brandis, D. (2000). The taxonomical status of the freshwater crab genus *Potamiscus* Alcock 1909 (Decapoda, Brachyura, Potamidae). *Senckenbergiana Biologica*, 80(1), 57–100.
- Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2016). Integrative analysis of sperm ultrastructure and molecular genetics supports the phylogenetic positioning of the sympatric rock shrimps *Sicyonia dorsalis* and *Sicyonia typica* (Decapoda, Sicyoniidae). *Zoomorphology*, 135, 67-81.
- Camargo, T. R., Rossi, N., Castilho, A. L., Costa, R. C., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2017). Sperm ultrastructure of shrimps from the family Penaeidae (Crustacea: Dendrobranchiata) in a phylogenetic context. *Arthropod structure & development*, 46(4), 588-600. <https://doi.org/10.1016/j.asd.2017.01.006>

- Campos, M. R., & Magalhães C. (2004). *Achagua* Campos, 2001, a new synonym of *Eudaniela* Preztmann, 1971, and the description of *Rodríguezes* gen. nov. (Decapoda: Brachyura: Pseudothelphusidae). *Nauplius*, 12(2), 95-97.
- Carvalho, E. A. S. de. (2013). A. Variabilidade genética e morfológica em populações de *Trichodactylus fluviatilis* Latreille, 1828 (*Brachyura*, *Trichodactylidae*) [Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências, Universidade de São Paulo]. Banco de Teses e Dissertações da USP.
<https://teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59139/tde-01112013-083827/publico/Edvandacorrigida.pdf>
- Castilho, G. G., Ostrensky, A., Pie, M. R., & Boeger, W. A. (2008). Morphology and histology of the male reproductive system of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (L.) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Acta Zoologica*, 89(2), 157–161.
<https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2007.00304.x>
- Clopton, R. E. (2004). Standard nomenclature and metrics of plane shapes for use in gregarine taxonomy. *Comparative Parasitology*, 71(2), 130–140.
<https://doi.org/10.1654/4151>
- Cobo, V. J., & Costa, A. S. (2012). Reproductive anatomy and behaviour of portunid crabs. *Marine and Freshwater Research*, 63(7), 622-633.
- Cumberlidge, N., Ng, P. K. L., Yeo, D. C. J., Magalhães, C., Campos, M. R., Alvarez, F., Naruse, T., Daniels, S. R., Esser, L. J., Attipoe, F. Y. K., Clotilde-Ba, F. L., Darwall, W., McIvor, A., Baillie, J., Collen, B., & Ram, M. (2009). Freshwater crabs and the biodiversity crisis: importance, threats, status, and conservation challenges. *Biological Conservation*, 142(8), 1665-1673. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.038>
- Cumberlidge, N., Ng, P. K. L., Yeo, D. C. J., Magalhães, C., Campos, M. R., Alvarez, F., Naruse, T., Daniels, S. R., & Esser, L. J. (2014). A global assessment of freshwater

crab diversity, threat, and conservation status. *PLoS ONE*, 9(9), e107843.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107843>

- Cumberlidge, N., & Ng, P. K. (2016). Systematics, evolution, and biogeography of freshwater crabs. In J. W. Martin, K. A. Crandall, & D. L. Felder (Eds.), *Decapod crustacean phylogenetics* (pp. 503-520). CRC Press.
- Cunningham, L. M., & Williams, A. B. (2002). Morphology of the male reproductive system in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Journal of Crustacean Biology*, 22(4), 695-704.
- De Grave, S., Felder, D. L., Lemaitre, R., Bauer, R. T., Ng, P. K. L., Schubart, C. D., Ah Yong, S. T., Lai, J. Y. T., & Wetzer, R. (2023). A classification and review of the diversity within Brachyura. *Journal of Marine Biodiversity*, 45(3), 200-215.
- De Oliveira, L. J. F., & Zara, F. J. (2018). An investigation into the male reproductive system of two freshwater crabs from the Amazon: is there a sperm plug or packet formation? *Marine and Freshwater Behavior and Physiology*, 51(4), 227-249.
- <https://doi.org/10.1080/10236244.2018.1523678>
- De Oliveira, L. J. F., Tudge, C., & Zara, F. J. (2021). Comparative morphology of the spermatophores and spermatozoa of three Amazon freshwater crabs (Decapoda, Brachyura, Trichodactylidae). *Journal of Natural History*, 55(29-30), 1877-1893.
- <https://doi.org/10.1080/00222933.2021.1973134>
- Diesel, R. (1989). Structure and function of the reproductive system of the symbiotic spider crab *Inachus phalangium* (Decapoda: majidae): observations on sperm transfer, sperm storage, and spawning. *Journal of Crustacean Biology*, 9(2), 266-277.
- <https://doi.org/10.1163/193724089X00089>
- Diesel, R. (1991). Sperm competition and mating behaviour in Brachyura. In: R. T. Bauer, & J. W. Martin (Eds.), *Crustacean sexual biology* (pp. 145-163). Columbia University Press.

- Du, N. S., Lei, W., Chen, L. Q., Xue, L. Z, Li, T. W., & Wang, L. (1999). Studies on the comparative ultrastructure of crab spermatozoa (Crustacea, Decapoda, Reptantia, Brachyura). *Zoological Research*, 20(5), 372–378. [In Chinese].
- Dudgeon, D. (1992). Endangered ecosystems: a review of the conservation status of tropical Asian rivers. *Hydrobiologia*, 248, 167-191.
- Dudgeon, D. (2000). The ecology of tropical Asian rivers and streams in relation to biodiversity conservation. *Annual Review Ecology, Evolution and Systematics*, 31, 239–263. <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.31.1.239>
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z. I., Knowler, D. J., Lévêque, C., Naiman, R. J., Prieur-Richard, A. H., Soto, D., Stiassny, M. L. J., & Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, 81(2), 163–182. 10.1017/S1464793105006950
- Erkan, M., Tunali, Y., Balkis, H., & Oliveria, E. (2009). Morphology of Testis and Vas Deferens in the Xanthoid Crab, *Eriphia verrucosa* (Forskal, 1775) (Decapoda: Brachyura). *Journal of Crustacean Biology*, 29(4), 458-465.
<https://doi.org/10.1651/08-3114.1>
- Fransozo, V., Fernandes, A. B., López-Greco, L. S., Zara, F. J., & Santos, D. C. (2016). Functional morphology of the male reproductive system of the white shrimp *Litopenaeus schmitti* (Burkenroad, 1936) (Crustacea, Penaeidea) compared to other *Litopenaeus*. *Invertebrate Reproduction & Development*, 60(3), 161-174.
<https://doi.org/10.1080/07924259.2016.1174158>
- Gotelli, N. J., & Ellison, A. M. (2004). *A primer of ecological statistics*. Sinauer Associates.
- Garcia Bento, M. A., Miranda, I., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2018). Comparative spermatozoal ultrastructure and molecular analysis in dromiid crabs and their phylogenetic implications for Dromiidae and Podotremata (Decapoda: Brachyura).

- Arthropod Structure & Development*, 47(6), 627-642. 10.1016/j.asd.2018.10.001
- Garcia, T., & Silva, J. (2006). Testis and vas deferens morphology of the red-clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata*) (Latreille, 1803). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(2), 339–345. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132006000300019>
- Guinot, D., & Quenette, G. (2005). The spermatheca in podotreme crabs (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Podotremata) and its phylogenetic implications. *Zoosystema*, 27(2), 267-342.
- Guinot, D., Jamieson, B. G. M., & Tudge, C. C. (1997). Ultrastructure and relationships of spermatozoa of the freshwater crabs *Potamon fluviatile* and *Potamon ibericum* (Crustacea, Brachyura, Potamidae). *Journal of Zoology*, 241(2), 229–244. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.1997.tb01955.x>
- Hartnoll, R. G. (2002). Reproductive control in the Brachyura. *Invertebrate Reproduction & Development*, 43(1), 77-91.
- Hinsch, G. W., & Walker, M. H. (1974). The vas deferens of the spider crab, *Libinia emarginata*. *Journal of Morphology*, 143(1), 1-19. 10.1002/jmor.1051430102
- Jamieson, B. G. M. (1989). The ultrastructure of the spermatozoa of four species of xanthid crabs (Crustacea, Brachyura, Xanthidae). *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 21, 579-586.
- Jamieson, B. G. M. (1991). Ultrastructure and phylogeny of crustacean spermatozoa. *Memoires of the Queensland Museum*, 31, 109-142.
- Jamieson, B. G. M. (1993). Ultrastructure of the spermatozoon of *Potamonautes perlatus sidneyii* (Heterotremata, Brachyura, Crustacea). *African Zoology*, 28(1), 40-45.
- Jamieson, B. G. M. (1994). Phylogeny of the Brachyura with particular reference to the Podotremata: evidence from a review of spermatozoal ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 345(1314), 373–393.

<https://doi.org/10.1098/rstb.1994.0116>.

- Jamieson, B. G. M., & Tudge, C. C. (1990). Dorippids ate Heterotremata: evidence from ultrastructure of the spermatozoa of *Neodorippe astuta* (Dorippidae) and *Portunus pelagicus* (Portunidae) Brachyura: Decapoda. *Marine Biology*, 106(3), 347-354.
<https://doi.org/10.1007/BF01344311>
- Jamieson, B. G. M., & Tudge, C. C. (2000). 1. Crustacea – Decapoda. In B. G. M. Jamieson (Ed.), *Reproductive Biology of Invertebrates, Progress in Male Gamete Ultrastructure and Phylogeny* (9th, pp. 1-95). John Wiley & Sons.
- Jayasankar, V., & Subramoniam, T. (1999). Antibacterial activity of seminal plasma of the mud crab *Scylla serrata* (Forsk.) *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 236(2), 253-259. [https://doi.org/10.1016/S0022-0981\(98\)00203-2](https://doi.org/10.1016/S0022-0981(98)00203-2)
- Johnson, P. T. (1980). Histology of the blue crab *Callinectes sapidus*: A model for the Decapoda. Praeger Publishers.
- Junqueira, L. C. U., & Junqueira, L. M. M. S. (1983). Técnicas Básicas de Citologia e Histologia.
- Klaus, S., & Brandis, D. (2011). Evolution of sperm morphology in potamid freshwater crabs (Crustacea: Brachyura: Potamoidea). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 161(1), 53–63. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2009.00625.x>
- Klaus, S., Münzner, S., Modenbach, A. C., Streit, B., & Tudge, C. C. (2013). Spermatophore formation and sperm ultrastructure of *Sundathelphusa philippina* (Crustacea: Brachyura: Gecarcinucidae). *Acta Zoologica*, 94(3) 1–6.
<https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.2011.00550.x>
- Klaus, S., Schubart, C. D., & Brandis, D. (2009). Ultrastructure of spermatozoa and spermatophores of oldworld freshwater crabs (Brachyura: Potamoidea: Gecarcinucidae, Potamidae, and Potamonautidae). *Journal of Morphology*, 270(2),

- 175–193. <https://doi.org/10.1002/jmor.10678>
- Krol, R. M, Hawkins, W. E., & Overstreet, R. M. (1992). Reproductive components. In F. W. Harrison, & A. G. Humes (Eds.), *Microscopic anatomy of invertebrates: Decapoda Crustacea* (10th, pp. 295-343). Wiley-Liss Inc.
- Kunčič, K., Mrak, P., & Žnidaršič, N. (2022). Formation and remodelling of septate junctions in the epidermis of isopod *Porcellio scaber* during development. *ZooKeys*, 1101, 159-181.
- Lima-Gomes, R. C. D. (2017). Análise filogenética dos caranguejos dulcícolas da família Trichodactylidae (Crustacea: Decapoda: Brachyura) com base no estudo morfológico-anatômico do esqueleto gástrico [Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia]. Banco de Teses e Dissertações. <https://repositorio.inpa.gov.br/handle/1/11492>
- López-Greco, L. S. (2013). Functional anatomy of the reproductive system. In L. Watling, & M. Thiel (Eds.), *Functional morphology and diversity of the crustaceans* (pp. 413-450). Oxford University Press.
- Magalhães, C. (1990) A new species of the genus *kingsleya* from amazonia, with a modified key for the brazilian pseudothelphusidae (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Zoologische mededelingen*. v.62, n.21, p.275-281.
- Magalhães, C. (2003a). The occurrence of freshwater crabs (Crustácea; Decapoda: Pseudothelphusidae, Trichodactylidae) in the Rio Xingu, Amazon Region, Brazil, with description of a new species of Psedothelphusidae. *Amazoniana*, 17(3/4), 377-386.
- Magalhães, C. (2003b). Famílias Pseudotheuphusidae e Trichodactylidae. In G. A. S. Melo (Ed.), *Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil*. (143-287). Editora Loyola.

- Magalhães, C., & Türkay, M. (2008). Pseudothelphusidae. In *Freshwater Animal Diversity Assessment* (pp. 251-256). Springer, Dordrecht.
- Magalhães, C. (2009). A new species of freshwater crab of the genus *Fredius* Pretzmann, 1967 from the middle Amazon River basin, Brazil (Crustacea: Decapoda: Pseudothelphusidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 122(1), 81-86. <https://doi.org/10.2988/08-35.1>
- Magalhães, C. (2016). Avaliação dos pseudotelfusídeos (Decapoda: Pseudotelfusidae). In M. A. A. Pinheiro, & H. Boos (Eds.), *Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014* (pp. 326-336). Sociedade Brasileira de Carcinologia – SBC. <http://crustacea.org.br/wp-content/uploads/2020/12/livro-vermelho-cap25-avaliacao-dos-pseudotelfusideos.pdf>
- Magalhães, C., & Turkay, M. (1986). Brasiliothelphusa, a new Brazilian freshwater-crab genus (Crustacea: Decapoda: Pseudothelphusidae). *Senckenbergiana biológica*, 66(4/6), 371-376.
- Magalhães, C., & Türkay, M. (1996a). Taxonomy of the neotropical freshwater crab family Trichodactylidae, I: the generic system with description of some new genera (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Senckenbergiana biológica*, 75, 63-95.
- Magalhães, C., & Türkay, M. (1996b). Taxonomy of the neotropical freshwater crab family Trichodactylidae II: the genera Forsteria, Melocarcinus, Sylviocarcinus and Zilchiopsis (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Senckenbergiana biológica*, 75, 97-130.
- Magalhães, C., & Türkay, M. (1996c). Taxonomy of the neotropical freshwater crab family Trichodactylidae III: the genera Fredilocarcinus and Goyazana (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Senckenbergiana biológica*, 75, 131-142.
- Magalhães, C., Sanches, V. Q., Pileggi, L. G., & Mantelatto, F. L. (2014). Morphological and

- molecular characterization of a new species of *Fredius* (Decapoda, Pseudothelphusidae) from Rondônia, southern Amazonia, Brazil. In D. C. J. Yeo, N. Cumberlidge, & S. Klaus (Eds.), *Advances in freshwater decapod systematics and biology* (pp. 101-114). Brill.
- Matos, E., Matos, P., Corral, L., & Azevedo, C. (1996). Ultrastructural and morphological aspects of the spermatozoon of *Dilocarcinus septemdentatus* Herbst, 1873 (Crustacea, Decapoda, Trichodactylidae) of the Northern sea coast of Brazil. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 13, 31–35.
- Mello, M. L. S., & Vidal, B. C. (1980). *Práticas de biologia celular*. Edgard Blucher; Fundação de desenvolvimento da Unicamp.
- Minagawa, M., Chiu, J. R., Kudo, M., & Takashima, F. (1994). Male reproductive biology of the red frog crab, *Ranina ranina*, off Hachijojima, Izu Islands, Japan. *Marine Biology*, 118, 393–401. <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00350296>
- Moriyasu, M., & Benhalima, K. (1998). Snow crabs, *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius, 1788) (Crustacea: Majidae) have two types of spermatophore: Hypotheses on mechanism of fertilization and population reproductive dynamics in the southern Gulf of St. Lawrence, Canada. *Journal of Natural History*, 32(10/11), 1651-1665. <https://doi.org/10.1080/00222939800771181>
- Nagao, J., & Munehara, H. (2003). Annual cycle of testicular maturation in the helmet crab *Telmessus cheiragonus*. *Fisheries Science*, 69(6), 1200–1208. <https://doi.org/10.1111/j.0919-9268.2003.00746.x>
- Nascimento, F. A., & Zara, F. J. (2013). Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Brachyura: portunidae). *Nauplius*, 21(2), 161–177. <https://www.scielo.br/j/nau/a/rRxBBVLMkB557HjGG9fTy6d/>
- Ng, P. K. L., Guinot, D., & Davie, P. J. F. (2008). Systema Brachyurorum: Part I. An

- Annotated Checklist of Extant Brachyuran Crabs of the World. *The Raffles Bulletin of Zoology*, 17, 1–286. <https://lkcnhm.nus.edu.sg/wp-content/uploads/sites/10/app/uploads/2017/04/s17rbz.pdf>
- Paschoal, L. R. P., & Zara, F. J. (2020). Size at onset of sexual maturity in *Macrobrachium amazonicum* (Heller, 1862) phenotypes: an integrative approach. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92(suplemento 2), 1-19. <https://doi.org/10.1590/0001-3675202020180560>
- Pedraza, M., Martinelli-Filho, J. E., & Magalhães, C. (2015). A new species of *Kingsleya* (Crustacea: Decapoda: Pseudothelphusidae) from the Xingu River and range extension for *Kingsleya junki*, Freshwater crabs from the southern Amazon basin. *Zoologia*, 32(1), 41-46. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702015000100006>
- Pedraza, M., Tavares, M., & Magalhães C. (2016). A new genus of freshwater crab of the tribe Kingsleyini Bott, 1970 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Pseudothelphusidae) with description of a new species from Mato Grosso, Brazil. *Zootaxa*, 4173(1), 94–100. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4173.1.9>
- Pinheiro, A. P., & Santana, W. R. A. (2016). A new and endangered species *Kingsleya* Ortmann, 1897 (Crustacea: Decapoda: Brachyura: Pseudothelphusidae) from Ceará, northeastern Brazil. *Zootaxa*, 4171(2), 365-372. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4171.2.9>
- Pralon, B., Pinheiro, A. P., & Santana, W. (2020). New species of freshwater crabs genus *Kingsleya* Ortmann, 1897 (Decapoda: Brachyura: (Pseudothelphusidae) from Piauí, northeastern Brazil. *Nauplius*, 28, 1-9. <https://doi.org/10.1590/2358-2936e2020021>
- Odum, E. P., & Barrett, G. W. (2004). *Fundamentals of Ecology*. Cengage Learning, Connecticut, USA.
- Oliveira, M. J. O. de, & Ferreira, S. D. R. (2018). A new species of *Siamthelphusa* Naiyanetr,

- 1994 (Crustacea: Brachyura: Gecarcinucidae) from Thailand. *Zootaxa*, 4370(1), 39–48.
- Ragionieri, L., & Hernández, E. (2009). Reproductive biology and gonadal morphology in the Brachyura (Crustacea: Decapoda). *Neotropical Biology and Conservation*, 4(2), 85-92.
- Ro, S., Talbot, P., Leung-Trujillo, J., & Lawrence, A. L. (1990). Structure and function of the vas deferens in the shrimp *Penaeus setiferus*: segments 1–3. *Journal of Crustacean Biology*, 10(3), 455-468.
- Rodríguez, G., & Magalhães, C. (2005). Recent advances in the biology of the Neotropical freshwater crab family Pseudothelphusidae (Crustacea, Decapoda, Brachyura). *Revista Brasileira de Zoologia*, 22(2), 354–365.
- Rodríguez, G. (1982). Les crabes d'eau douce d'Amerique. Famille des Pseudothelphusidae. Office de la Recherche Scientifique et Technique Outre-Mer.
- Rodríguez, G. (1992). *The Freshwater Crabs of America. Family Trichodactylidae, and Supplement to the Family Pseudothelphusidae*. (Faune Tropicale XXXI). Orstom Editions.
- Rodríguez, G., & Campos, M. R. (1998). A cladistic revision of the genus *Fredius* (Crustacea: Decapoda: Pseudothelphusidae) and its significance to the biogeography of the Guianan lowlands of South America. *Journal of Natural History*, 32(5): 763–775. <https://doi.org/10.1080/00222939800770391>
- Rodríguez, G., & López, B. (2003). Insular species of Neotropical freshwater crabs (Crustacea: Brachyura). *Journal of Natural History*, 37(21), 2599-2614. <https://doi.org/10.1080/00222930210155710>
- Rodrigues, A. F., & Melo, G. A. S. (2009). A revisão das espécies de Melothelphusa (Decapoda: Pseudothelphusidae) do Brasil, com a descrição de novas espécies. *Zootaxa*, 2041, 1-50.
- Santos, C. M., Lima, G. V., Nascimento, A. A., Sales, A., & Oshiro, L. M. Y. (2009).

- Histological and histochemical analysis of the gonadal development of males and females of *Armases rubripes* (Rathbun 1897) (Crustacea, Brachyura, Sesarmidae). *Brazilian Journal of Biology*, 69(1), 161-169. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842009000100021>
- Santos, L. C., Tavares, M., Silva, J. R. F., Cervini, M., Pinheiro, A. P., & Santana, W. (2020). A new species of freshwater crab genus *Fredius* Pretzmann, 1967 (Crustacea: Brachyura: Pseudothelphusidae) from a naturally isolated orographic forest enclave within the semiarid Caatinga in Ceará, northeastern Brazil. *PeerJ*, 1-24. [10.7717/peerj.9370](https://doi.org/10.7717/peerj.9370)
- Scalici, M., Scuderi, S., & Gibertini, G. (2010). Gonad structure in the river crab, *Potamon fluviatile* (Herbst, 1785) (Decapoda: Brachyura). *Crustaceana*, 83(1), 61–72.
- Silva, L. S. (2010). Estrutura populacional e maturidade sexual de *Sylviocarcinus pictus* (h. Milne-Eduards, 1853) e *S. sevillei* h. Milne-Eduards, 1853 (Brachyura, Trichodactylidae) das ilhas do estuário amazônico no entorno de Belém, Pará, Brasil. [Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará]. Banco de Teses e Dissertações da UFPA. <https://repositorio.ufpa.br/jspui/handle/2011/3500>
- Silva, L. S., Martinelli-Lemos, J. M., Ferreira, M. A. P., & Rocha, R. M. (2012). Gonadal development in the freshwater crab *Sylviocarcinus pictus* (H. Milne Edwards, 1853) (Brachyura: Trichodactylidae) from the Guamá River, State of Pará, Brazil. *Biological Sciences – Anais da Academica Brasileira de Ciências*, 84(3), 789–798. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012000300021>
- Simeó, C. G., Kurtz, K., Chiva, M., Ribes, E., & Rotllant, G. (2010). Spermatogenesis of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). *Journal of Morphology*, 271(4), 394–406. <https://doi.org/10.1002/jmor.10805>

- Simeó, C. G., Ribes, E., & Rotllant, G. (2009). Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). *Tissue Cell*, 41(5), 345–361. doi: 10.1016/j.tice.2009.02.002
- Strayer, D. L. (2006). Challenges for freshwater invertebrate conservation. *Journal of the North American Benthological Society*, 25(2), 271–287. [https://doi.org/10.1899/0887-3593\(2006\)25\[271:CFFIC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1899/0887-3593(2006)25[271:CFFIC]2.0.CO;2)
- Subramoniam, T. (1983). Spermatophores and sperm transfer in marine crustaceans. In: J. H. S. Blaxter, & A. J. Southward (Eds.), *Advances in Marine Biology*. (pp. 129–214). Academic Press.
- Tiseo, G. R., Mantelatto, F. L. M., & Zara, F. J. (2014). Is cleistospermy and coenospermy related to sperm transfer? A comparative study of the male reproductive system of *Pachygrapsus transversus* and *Pachygrapsus gracilis* (Brachyura: Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology*, 34, 704–716. <https://doi.org/10.1163/1937240X-00002275>
- Tiseo, G. R., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2017). Ultrastructure of spermatophores and spermatozoa of intertidal crabs *Pachygrapsus transversus*, *Pachygrapsus gracilis* and *Geograpsus lividus* (Decapoda: Gaapsidae). *Zoologischer Anzeiger*, 269, 166–176. <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2017.07.002>
- Tsang, L. M., Schubart, C. D., Ahyong, S. T., Lai, J. C., Au, E. Y., Chan, T. Y., Ng, K. L. P., & Chu, K. H. (2014). Evolutionary history of true crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) and the origin of freshwater crabs. *Molecular biology and evolution*, 31(5), 1173–1187. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu068>
- Tudge, C. C. (2009). Spermatozoal morphology and its bearing on decapod phylogeny. In J. W. Martin, K. A. Crandall, & D. L. Felder (Eds.), *Decapod Crustacean phylogenetics* (pp. 101–119). CRC Press, Taylor and Francis Group.
- Tudge, C. C., & Jamieson, B. G. M. (1991). Ultrastructure of the mature spermatozoon of the

- Coconut Crab *Birgus latro* (L.) (Coenobitidae, Paguroidea, Decapoda). *Marine Biology*, 108, 395-402.
- Tudge, C. C., & Justine J.-L. (1994). The cytoskeletal proteins actin and tubulin in the spermatozoa of four decapod crabs (Crustacea, Decapoda). *Acta Zoologica*, 75(4), 277–285. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6395.1994.tb00964.x>
- Tudge, C. C., Scheltinga, D. M., Jamieson, B. G. M., Guinot, D., & Richer de Forges, B. (2014). Comparative ultrastructure of the sperm of the Majoidea (Crustacea, Decapoda, Brachyura) with new data on six species in five genera. *Acta Zoologica*, 95(1), 1–20. <https://doi.org/10.1111/azo.12005>
- Wang, L., Du, N. S., & Lai, W. (1999). Studies on spermiogenesis of a freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* (Crustacea Decapoda). *Acta Hydrobiol Sinica.*, 23(1):1–7.
- Watanabe, T. T., Nascimento, F. A., Mantelatto, F. L., & Zara, F. J. (2020). Ultrastructure and histochemistry of the male reproductive system of the genus *Callinectes* Stimpson, 1860 (Brachyura: Portunidae). *Journal of Morphology*, 281(12), 1660–1668. [10.1002/jmor.21277](https://doi.org/10.1002/jmor.21277)
- Wolfe, J. M., Ballou, L., Luque, J., Watson-Zink, V. M., Ahyong, S. T., Barido-Sottani, J., Chan, T. Y., Chu, K. H., Crandall, K. A., Daniels, S. R., Felder, D. L., Harrison, M., Martin, J. W., Ng, P. K. L., Ortega-Hernández, J., Theil, E. P., Pentcheff, N. D., Robles, R., Thoma, Brent P., ... Bracken-Grissom, H. D. (2023). Convergent adaptation of true crabs (Decapoda: Brachyura) to a gradient of terrestrial environments. *Systematic Biology*, 73(2), 247–262. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syad066>
- Zara, F. J., Toyama, M. H., Caetano, F. H., & López-Greco, L. S. (2012). Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue crab, *Callinectes danae* (Portunidae). *Journal of Crustacean Biology*, 32(2), 249–262.

<https://doi.org/10.1163/193724011X615479>