

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Morfologia comparada do sistema reprodutor  
masculino e transferência espermática de  
caranguejos da família Trichodactylidae H. Milne  
Edwards, 1853 (Decapoda, Brachyura)**

**Leo Jaime Filgueira de Oliveira**

Jaboticabal, São Paulo

2017

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**  
**CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP**

**Morfologia comparada do sistema reprodutor  
masculino e transferência espermática de  
caranguejos da família Trichodactylidae H. Milne  
Edwards, 1853 (Decapoda, Brachyura)**

**Leo Jaime Filgueira de Oliveira**

**Orientador: Dr. Fernando José Zara**

**Coorientador: Bruno Sampaio Sant’Anna**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura do Centro de Aquicultura da UNESP - CAUNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura (Biologia Aquática).

Jaboticabal, São Paulo

2017

Oliveira, Leo Jaime Filgueira de

O48m Morfologia comparada do sistema reprodutor masculino e transferência espermática de caranguejos da família Trichodactylidae H. Milne Edwards, 1853 (Decapoda, Brachyura) / Leo Jaime Filgueira de Oliveira. -- Jaboticabal, 2017  
xii, 85 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, 2017

Orientador: Fernando José Zara

Coorientador: Bruno Sampaio Sant'Anna

Banca examinadora: Mariana Terossi Rodrigues Mariano, William Ricardo Amâncio Santana

Bibliografia

1. Caranguejo de água doce. 2. Morfologia. 3. Reprodução. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura.

CDU 639.518

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO: *Morfologia comparada do sistema reprodutor masculino e transferência espermática de caranguejos da família Trichodactylidae H. Milne Edwards, 1853 (Decapoda, Brachyura)*

**AUTOR: LEO JAIME FILGUEIRA DE OLIVEIRA**

**ORIENTADOR: FERNANDO JOSÉ ZARA**

**COORIENTADOR: BRUNO SAMPAIO SANT'ANNA**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AQUICULTURA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. FERNANDO JOSÉ ZARA  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. MARIANA TEROSSI RODRIGUES MARIANO  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo



Prof. Dr. WILLIAM RICARDO AMÂNCIO SANTANA  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação / Universidade Sagrado Coração

Jaboticabal, 25 de outubro de 2017.

*“A inteligência está além de equipamentos cognitivos. A ideia de uma inteligência mais apurada está mais associada a percepção de que, para se chegar a algum lugar no conhecimento, você depende de muita gente à sua volta”.*

**Luiz Felipe Pondé**

*“A tragédia não é quando um homem morre. A tragédia é aquilo que morre dentro de um homem enquanto ele ainda está vivo”.*

**Albert Schweitzer**

*“Há três caminhos para o sucesso: 1 – ensinar o que se sabe (generosidade mental); 2 – praticar o que se ensina (coerência ética); 3 – perguntar o que se ignora (humildade intelectual)”.*

**Mário Sergio Cortella**

Ao meu pai João Jaime de Oliveira (*in memoriam*), minha mãe Maria José Pena Filgueira, irmã Marleicy, sobrinhas Mirela e Mariana e avós José Filgueira e Alexandrina Filgueira que demonstram constantemente todo seu amor por mim, mesmo estando sempre distante e ausente.

À minha noiva Aldenize Oliveira e minha segunda Família, Aristino e Fátima, Alteniza, Altemiza e Adison. Todo amor à vocês!

## **Agradecimentos**

Ao programa de Pós-graduação em Aquicultura (CAUNESP) pela bolsa CNPq (#134523/2015-6) concedida para realização deste trabalho.

Aos auxílios vinculados ao IML, CAPES Ciências do Mar (CIMAR) II (Proc. #1989/2014) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Biota #2010/50188-8 e 2016/25344-2).

Ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) pela autorização #52258-1 para captura dos animais utilizados neste estudo.

Ao Prof. Dr. Fernando José Zara pela recepção, orientação e importantes ensinamentos nos âmbitos pessoal e profissional durante meu período de mestrado no Invertebrate Morphology Laboratory (IML) – FCAV/Unesp – Jaboticabal.

Ao meu Coorientador Prof. Dr. Bruno Sampaio Sant'Anna pelo apoio juntamente com o Prof. Dr. Gustavo Yomar Hattori pela recepção no Laboratório de Zoologia (ICET/UFAM), auxílio nas coletas, ideias que contribuíram para a realização deste trabalho e pela amizade e respeito. Além disso, pelos ensinamentos no âmbito pessoal e principalmente de como a ética pode ser o alicerce pessoal/profissional.

Às colegas de trabalho e amigos do IML Camila Assugeni, Fernanda Salti, Maria Alice e Bárbara Paiva pelas conversas e convivência que contribuíram para esse trabalho. Ao Timóteo Watanabe, Lucas Paschoal e Guilherme Andrioli pelo apoio e bate-papos científicos (ou não) e pelos trabalhos em cooperação (sempre trabalhando e relaxando!). Especialmente à Márcia Fiorese Mataqueiro, com quem muito aprendi e me auxiliou em todos os procedimentos laboratoriais no IML nos momentos que precisei.

À Chica, técnica do Laboratório de Histopatologia do Departamento de Patologia Veterinária da FCAV/Unesp – Jaboticabal pelas dicas e auxílio no processamento de material biológico.

Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da FCAV/Unesp – Jaboticabal por me permitirem utilizar materiais e equipamentos.

À Márcia, Aracyara, Aldo e Lucinda, e todo o pessoal do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária (FCAV/Unesp – Jaboticabal) pela permissão na utilização das dependências deste departamento, auxílio em quaisquer fossem minhas dúvidas e obrigações burocráticas.

Aos funcionários do Caunesp, David Lorente e Veralice Cappatto pelos auxílios em todas as burocracias da PG.

Ao pessoal do Laboratório de Zoologia do ICET/UFAM, Neucilene Almeida, Loyanna Pedreño, Karine Coelho, Eberlanny Rolim pelas informações, disposição em auxiliar nas coletas e cuidados com os animais nos aquários em Itacoatiara.

Aos meus amigos de Ita, pelo apoio incondicional, Elidianne, Bruna, Taty, Ray, Khalled, CJ, Mad e Danilo pelo apoio incondicional. Pelo auxílio em algumas coletas e fuga dos búfalos com o George! Haja coração!

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP/FCAV e às técnicas Claudinha e Cláudia por todo suporte, ajuda e atenção com o microscópio eletrônico de transmissão.

Ao Dr. Célio Magalhães pelo auxílio na confirmação da identificação das espécies coletadas em Itacoatiara (AM) utilizadas neste estudo.

Ao Fabrício Carvalho e Edvanda Carvalho pela confirmação da identificação dos animais coletados em Cotriguaçu (MT).

Ao PhD. Christopher Tudge pela amizade, bate-papos, ensinamentos em espermiotaxonomia durante o curso em Jaboticabal e no CBC 2016 em Juazeiro do Norte.

Aos membros da minha banca de qualificação profa. Dra. Maria Célia Portella e profa. Dra. Mariana Antunes da Silva pelas sugestões e correções deste trabalho.

À profa. Dra. Mariana Terossi Rodrigues Mariano e ao prof. Dr. William Ricardo Amâncio Santana, membros da banca de defesa de dissertação, pelas correções e excelentes sugestões que ajudaram a aprimorar os manuscritos.

À minha noiva Aldenize Oliveira, por todo seu amor, chatices, carinho, gordices, cumplicidade, maluquices, diversões e compreensão. Acima de tudo, por segurar a onda comigo! Amo você!

À Alteniza Oliveira e Daniel Estumano por tudo! Ainda não encontrei adjetivos para expressar o quanto vocês são fantásticos!

À minha segunda família, Aristino Magalhães de Oliveira, Maria de Fátima Lima de Oliveira, Adison, Alteniza e Altemiza pelo apoio incondicional, carinho e compreensão.

Ao Timóteo Watanabe e Adriany Pimentão por me receberem em sua residência e pelas ajudas prestadas durante minha permanência em Jaboticabal. Vocês são incríveis! Sem palavras para descrever o meu apreço por vocês. Ao Guilherme Andrioli e Gabriela Monteiro por todo apoio prestado em Jaboticabal. Obrigado pela amizade, todos encontros e comelaças desestressantes!

Muito obrigado!

## **Apoio financeiro**

CNPq – Bolsa modalidade GM (Mestrado) (#134523/2015-6)

BIOTA FAPESP (#2010/50188-8 e #2016/25344-2)

CAPES CIMAR II (#1989/2014-23038.004309/2014-51 e #2005/2014 - 23038.004308/2014-

14)

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	13
<b>Abstract</b> .....	14
<b>Introdução Geral</b> .....	15
<b>Referências</b> .....	18
<b>Capítulo I.</b> Morfologia do sistema reprodutor masculino, espermatogênese e produção de fluido seminal em <i>Dilocarcinus pagei</i> e <i>Sylviocarcinus pictus</i> (Decapoda: Trichodactylidae): existe formação de “plug” ou pacote espermático em caranguejos de água doce? .....	24
<b>Resumo</b> .....	26
<b>Abstract</b> .....	27
<b>Introdução</b> .....	28
<b>Material e métodos</b> .....	30
<b>Resultados</b> .....	32
<i>Anatomia</i> .....	32
<i>Histologia e histoquímica</i> .....	32
<i>Dilocarcinus pagei</i> .....	32
<i>Sylviocarcinus pictus</i> .....	35
<i>Experimento de transferência espermática</i> .....	38
<b>Discussão</b> .....	38
<b>Referências</b> .....	47
<b>Lista de Tabela</b> .....	54
<b>Lista de Figuras</b> .....	55
<b>Capítulo II.</b> Ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides de <i>Dilocarcinus pagei</i> , <i>Zilchiopsis oronensis</i> e <i>Valdivia serrata</i> (Crustacea: Decapoda: Trichodactylidae) .....	67

<b>Resumo</b> .....	69
<b>Abstract</b> .....	70
<b>Introdução</b> .....	71
<b>Material e métodos</b> .....	73
<b>Resultados</b> .....	74
<i>Dilocarcinus pagei</i> .....	74
<i>Zilchiopsis oronensis</i> .....	76
<i>Valdivia serrata</i> .....	77
<b>Discussão</b> .....	78
<b>Referências</b> .....	84
<b>Lista de Tabela</b> .....	89
<b>Lista de Figuras</b> .....	91
<b>Considerações finais</b> .....	97

## Resumo

O sistema reprodutor masculino em caranguejos de água doce da família Trichodactylidae ainda é pouco conhecido. No capítulo I deste estudo foram analisados a morfologia do sistema reprodutor masculino, espermatogênese e produção de fluido seminal de *Dilocarcinus pagei* e *Sylviocarcinus pictus*, bem como a investigação experimental sobre a transferência espermática para verificar se o fluido seminal forma “plug” ou pacote espermático em *D. pagei*. O sistema reprodutor masculino em Trichodactylidae apresenta morfologia de “U” invertido, conectados pelos testículos, e vasos deferentes divididos em anterior (AVD), médio (MVD) e posterior (PVD). A espermatogênese ocorre de forma similar em ambas espécies, e a produção do fluido seminal para formação de espermátóforos ocorre na AVD, sendo a MVD responsável pelo armazenamento e PVD pela produção de fluido seminal adicional para transferência espermática. Não há formação de “plug” espermático, mas há formação de pacotes espermáticos quando em múltiplas cópulas com diferentes machos. No capítulo II desta dissertação foram investigados os espermatozoides de *D. pagei*, *Zilchiopsis oronensis* e *Valdivia serrata* em um enfoque filogenético, comparando também ao único tricodactilídeo descrito, *Dilocarcinus septemdentatus*. As espécies estudadas apresentam espermátóforos coenospérmicos. *Zilchiopsis oronensis* e *V. serrata* apresentaram também cleistospermia. Os espermatozoides apresentam morfologia globular, com opérculo pontiagudo fechado e vesícula acrossomal com três camadas concêntricas de diferentes eletrondensidades. As três espécies neste estudo, bem como *D. septemdentatus* apresentam uma placa núcleo-citoplasmática espessa e elétron-densa que provavelmente é uma autapomorfia para Trichodactylidae. Esta característica diverge dos outros caranguejos de água doce da Ásia e África, suportando a hipótese do surgimento de duas linhagens independentes de caranguejos dulcícolas.

**Palavras-chave:** caranguejo de água doce; morfologia; reprodução.

**Abstract**

The male reproductive system in freshwater crabs of the family Trichodactylidae is still little known. In Chapter I of this study, we studied the morphology of the male reproductive system, spermatogenesis and seminal fluid production of *Dilocarcinus pagei* and *Sylviocarcinus pictus*, as well as the experimental investigation on the sperm transfer to verify if the seminal fluid create a sperm plug or spermatid package in *D. pagei*. The male reproductive system in Trichodactylidae shows inverted U-shape, connected by the testes, and vas deferens divided into anterior (AVD), medium (MVD) and posterior (PVD). Spermatogenesis occurs in a similar way in both species, and seminal fluid production for spermatophore formation occurs in AVD, and MVD is responsible for storage and PVD for the production of additional seminal fluid for sperm transfer. There is no sperm plug formation, but there is formation of spermatid packets when in multiple copulations with different males. In Chapter II of this work, the spermatozoa of *D. pagei*, *Zilchiopsis oronensis* and *Valdivia serrata* were investigated in a phylogenetic context, also comparing to the trichodactylid described, *Dilocarcinus septemdentatus*. The species studied present coenospermic spermatophores. *Zilchiopsis oronensis* and *V. serrata* also presented cleistospermia. The morphology of the spermatozoa is globular, with closed operculum and acrosomal vesicle with three concentric layers in different electron densities. The three species in this study, as well as *D. septemdentatus* present a thick and electron dense nucleo-cytoplasmic plate that is probably an autapomorphy for Trichodactylidae. This feature differs from other freshwater crabs of Asia and Africa, supporting the hypothesis of the emergence of two independent lineages of freshwater crabs.

**Keywords:** freshwater crab; morphology; reproduction.

## **Introdução Geral**

A Infraordem Brachyura compreende cerca de 7.250 espécies descritas (Davie et al. 2015), dentre os quais estão cinco famílias de caranguejos de água doce. Estas famílias apresentam aproximadamente 1300 espécies com distribuição nas regiões tropical e subtropical das Américas Central e do Sul, África, Europa, Ásia e Austrália (Yeo et al. 2008; Cumberlidge & Ng 2009). Dentre os caranguejos de água doce neotropicais estão as famílias Pseudothelphusidae Ortmann, 1893 e Trichodactylidae H. Milne Edwards, 1853, que apresentam espécies exclusivas da região amazônica (Magalhães et al. 2016). A família Trichodactylidae apresenta cerca de 50 espécies semi-terrestres exclusivamente dulcícolas, distribuídos nas Américas Central e do Sul, desde o sul do México até a Argentina (Yeo et al. 2008; Magalhães et al. 2016).

Os caranguejos da família Trichodactylidae H. Milne Edwards, 1853 habitam rios e lagos, em áreas marginais com barranco, no interior de buracos em áreas rasas e associados à macrófitas flutuantes (Magalhães 2016). Estes animais são importantes componentes dos ecossistemas em que habitam participando do fluxo de energia da teia trófica, atuando como necrófagos (Segadilha & Silva-Soares 2015), predadores de anuros (Affonso & Signorelli 2011), moluscos (Torres et al. 2012) e presas de diversos vertebrados (Magalhães 1990; Silveira & Magnusson 1999; Quadros & Monteiro-Filho 2001; Lima & Batista 2012).

As famílias de caranguejos de água doce compreendem um grupo polifilético (Tsang et al. 2014), entretanto apresentam diversas características de convergência evolutiva. Estes animais desenvolveram adaptações morfológicas e fisiológicas aos ambientes dulcícolas desenvolvidos durante sua história de vida (Stevcic 1971). Dentre as adaptações está a baixa fecundidade com ovos lecitotróficos (Mansur & Hebling 2002), desenvolvimento direto (Vieira et al. 2013), cuidado parental (Sant'Anna et al. 2013) e ausência de fases larvais pelágicas (Vogt 2013). Com isso, estes animais apresentam ampla distribuição geográfica (Magalhães et al.

2016), e no Brasil podem ser encontrados em serrapilheiras, associados à macrófitas (Magalhães 2003), tocas nas margens de rios e lagos (Sant’Anna et al. 2013), em regiões montanhosas, associados a bromélias (Wehrtmann et al. 2016) e planícies de inundação periódicas (Magalhães & Türkay 2008).

Além de sua importância ecológica, participando em vários níveis da teia trófica, os caranguejos tricodactídeos foram reportados como item alimentar na dieta de índios Yanomami (Magalhães et al. 2006). Apesar destes animais terem recebido atenção quanto aos estudos relacionados à sua biologia populacional (Davanso et al. 2013), fecundidade (Silva et al. 2012), cuidado parental (Sant’Anna et al. 2013), comportamento (Senkman et al. 2015; Sant’Anna et al. 2014) e fisiologia (Onken & McNamara 2002), são escassos estudos sobre biologia de Trichodactylidae na Amazônia brasileira.

Espécies dos gêneros *Dilocarcinus* H. Milne Edwards, 1853, *Sylviocarcinus* H. Milne Edwards, 1853 e *Valdivia* White, 1847 foram encontrados como fauna acompanhante na pesca de camarões no Estado do Pará (Lima et al. 2013). A captura desta fauna acompanhante pode levar à morte e descarte destes animais, pois não apresentam valor comercial culinário como os camarões. Com isso, pode haver declínio das populações de caranguejos de água doce como consequência da captura acidental excessiva (Eayrs 2007). Assim, estudos sobre a biologia de Trichodactylidae são importantes para se obter dados sobre o estado de conservação destes animais (Magalhães 2016).

Recentemente, diversos estudos têm adicionado dados relevantes à taxonomia a partir de dados morfológicos do sistema endofragmal de Trichodactylidae. Sternberg & Cumberlidge (2003) examinaram o sistema torácico endofragmal em *Poppiana* Bott, 1969 e *Trichodactylus* Latreille, 1828 e identificaram diversas características derivadas que parecem ser restritas a tricodactídeos. Pedraza et al. (2015) analisaram o esqueleto axial de 17 espécies em 10 gêneros dando suporte a particularidades ao nível de família, subfamília e tribo. Lima-Gomes et al.

(2017) apresentaram novos dados sobre a estrutura dos ossículos do sistema digestivo em *Sylviocarcinus pictus* H. Milne Edwards, 1853 e *Valdivia serrata* White, 1847 que podem ser úteis para identificar relações taxonômicas neste grupo.

Estudos sobre o sistema reprodutor de crustáceos decápodes têm sido extensivamente realizados em animais marinhos. Estes trabalhos são relevantes para entender não só os aspectos reprodutivos (Castilho et al. 2008; Zara et al. 2012), como também a filogenia destes animais (Camargo et al. 2015, 2017). Em relação a animais dulcícolas, a maioria dos estudos está concentrada nas superfamílias Potamoidea (Klaus et al. 2009; Klaus & Brandis 2011) e Gecarcinucoidea (Klaus et al. 2009; Klaus et al. 2011), de ocorrência principalmente nos continentes da África e Ásia.

Os tricodactilídeos foram pouco estudados quanto a morfologia, histologia e histoquímica do sistema reprodutor. Dentre os poucos estudos realizados, está o desenvolvimento gonadal de *S. pictus* investigado por Silva et al. (2012). Entretanto, este estudo apresenta lacunas que ainda necessitam ser preenchidas, tais como a formação dos espermatóforos, características histoquímicas do fluido seminal, espermatogênese e morfologia dos espermatozoides. Esta última somente foi descrita em *Dilocarcinus septemdentatus* Herbst, 1783 foi descrito (Matos et al. 1996). Ainda não existem estudos sobre a morfologia do sistema reprodutor masculino em outros Trichodactylidae, estando os trabalhos restritos a outros aspectos da biologia destes animais.

A região amazônica necessita de estudos sobre a biologia de caranguejos tricodactilídeos, uma vez que estes animais são abundantes nos rios, lagos e planícies de inundação. Compreender a biologia reprodutiva e seu ciclo nestes caranguejos pode auxiliar no entendimento de como estes animais participam das comunidades naqueles ambientes. Além disso, estes animais são indicadores de qualidade ambiental e com a rápida expansão do agronegócio e hidroelétricas, muitas espécies podem desaparecer sem mesmo terem sido

descobertas pela ciência. Com isso, o presente estudo visa fornecer informações sobre a biologia reprodutiva, especificamente sobre a morfologia do sistema reprodutor masculino e descrição da morfologia dos espermatozoides de caranguejos da família Trichodactylidae.

Assim, a estrutura da presente dissertação está organizada em dois capítulos. O primeiro trata da descrição e comparação da morfologia do sistema reprodutor masculino de *S. pictus* e *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861, com detalhes sobre a espermatogênese ao microscópio de luz para cada uma destas espécies. No segundo capítulo foi realizada a descrição e comparação dos espermatozoides em de três espécies de Trichodactylidae: *D. pagei*, *Zilchiopsis oronensis* (Pretzmann, 1968) e *V. serrata*.

## Referências

- Affonso IP, Signorelli L. 2011. Predation on frogs by the introduced crab *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861 (Decapoda, Trichodactylidae) on a Neotropical floodplain. *Crustaceana* 84: 1653–1657.
- Camargo TR, Rossi N, Castilho AL, Costa RC, Mantelatto FL, Zara FJ. 2015. 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 TR, Rossi N, Castilho AL, Costa RC, Mantelatto FL, Zara FJ. 2017. Sperm ultrastructure of shrimp from family Penaeidae (Crustacea: Dendrobranchiata) in a phylogenetic context. *Arthropod Structure & Development* 10: 588–600.
- Castilho GG, Ostrensky A, Pie MR, Boeger WA. 2008. Morphology and histology of the male reproductive system of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (L.) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Acta Zoologica* 89: 157–161.

- Cumberlidge N, Ng PKL. 2009. Systematics, evolution, and biogeography of freshwater crabs. In: Martin JW, Crandall KA, Felder DL, editors. Decapod crustacean phylogenetics. Crustacean Issues. Boca Raton: Taylor and Francis/CRC Press.
- Davanso TM, Taddei FG, Simões SM, Fransozo A, Costa RC. 2013. Population dynamics of the freshwater crab *Dilocarcinus pagei* in tropical waters in southeastern Brazil. Journal of Crustacean Biology 33: 235–243.
- Eayrs S. 2007. A Guide to by-catch reduction in Tropical shrimp-trawl fisheries. FAO. Rome. 108 pp.
- Davie PJ, Guinot D, Ng PK. 2015. Systematics and classification of Brachyura. In: Castro P, Davie PJF, Guinot D, Schram FR, von Vaupel Klein JC, editors. Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Crustacea, Vol. 9, Part C (2 vol.). Leiden: Brill; pp. 1049–1130.
- Klaus S, Brandis D. 2011. Evolution of sperm morphology in potamid freshwater crabs (Crustacea: Brachyura: Potamoidea). Zoological Journal of the Linnean Society 161: 53–63.
- Klaus S, Schubart CD, Brandis D. 2009. Ultrastructure of spermatozoa and spermatophores of old world freshwater crabs (Brachyura: Potamoidea: Gecarcinucidae, Potamidae, and Potamonautidae). Journal of Morphology 270: 175–193.
- Klaus S, Münzner S, Modenbach AC, Streit B, Tudge CC. 2011. Spermatophore formation and sperm ultrastructure of *Sundathelphusa philippina* (Crustacea: Brachyura: Gecarcinucidae). Acta Zoologica 94: 267–272.
- Lima LG, Batista VS. 2012. Estudos etnoictiológicos sobre o pirarucu *Arapaima gigas* na Amazônia Central. Acta Amazonica 42: 337–344.

- Lima-Gomes RC, Lima JF, Magalhães C. 2017. Description of ten additional ossicles in the foregut of the freshwater crabs *Sylviocarcinus pictus* and *Valdivia serrata* (Decapoda: Trichodactylidae). *Zoologia* 34: 1–7.
- Lima JF, Silva TC, Silva LMA, Garcia JS. 2013. Brachyuran crustaceans from the bycatch of prawn fisheries at the mouth of the Amazon River. *Acta Amazonica* 43: 91–98.
- Magalhães C. 1990. Hábitos alimentares e estratégia de forrageamento de *Rostrhamus sociabilis* no Pantanal de Mato Grosso, Brasil. *Ararajuba* 1: 95–98.
- Magalhães C. 2003. Famílias Pseudothelphusidae e Trichodactylidae. In: Melo GAS, editor. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. São Paulo: Editora Loyola; pp. 143–287.
- Magalhães C. 2016. Avaliação dos caranguejos tricodactilídeos (Decapoda: Trichodactylidae). In: Pinheiro MAA, Boos H, editors. Livro Vermelho dos Crustáceos do Brasil: Avaliação 2010-2014. Porto Alegre, RS: Sociedade Brasileira de Carcinologia – SBC. pp. 420–440.
- Magalhães C, Barbosa UC, Py-Daniel V. 2006. Decapod crustaceans used as food by the Yanomami Indians of the Balawa-ú village, State of Amazonas, Brazil. *Acta Amazonica* 36: 369–374.
- Magalhães C, Campos MR, Collins PA, Mantelatto FL. 2016. Diversity, distribution and conservation of freshwater crabs and shrimps in South America. In: Kawai T, Cumberlidge N, editors. A global overview of the conservation of freshwater decapod crustaceans. Berlin: Springer. pp. 303–322.
- Magalhães C, Türkay M. 2008. Taxonomy of the Neotropical freshwater crab family Trichodactylidae. *Senckenbergiana Biologica* 19: 185–215.
- Mansur CB, Hebling NJ. 2002. Análise comparativa entre a fecundidade de *Dilocarcinus pagei* Stimpson e *Sylviocarcinus australis* Magalhães & Turkay (Crustacea, Decapoda,

- Trichodactylidae) no Pantanal do Rio Paraguai, Porto Murtinho, Mato Grosso do Sul. *Revista Brasileira de Zoologia* 19: 797–805.
- 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.
- Ng P, Guinot D, Davie P. 2008. Systema Brachyrorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world. *The Raffles Bulletin of Zoology* 17: 1–286.
- Onken H, McNamara JC. 2002. Hyperosmoregulation in the red freshwater crab *Dilocarcinus pagei* (Brachyura, Trichodactylidae): structural and functional asymmetries of the posterior gills. *The Journal of Experimental Biology* 205: 167–175.
- Pedraza M, Magalhães C, Tavares M. 2015. Morfología comparada del esqueleto axial en la familia de cangrejos de agua dulce Trichodactylidae (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Papéis Avulsos de Zoologia* 55: 103–114.
- Quadros J, Monteiro-Filho ELA. 2001. Diet of the Neotropical otter, *Lontra longicaudis*, in an Atlantic forest area, Santa Catarina State, southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 36: 15–21.
- Sant’Anna BS, Andrade DR, Watanabe TT, Hattori GY. 2014. Behavioral repertoire and substrate choice of the freshwater crab *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861 (Decapoda, Trichodactylidae). In: Ardovini C. editor. *Crabs: global diversity, behavior and environmental threats*. New York: Nova Science Publishers. pp. 57–73.
- Sant’Anna BS, Takahashi LHT, Hattori GY. 2013. Parental care in the freshwater crab *Sylviocarcinus pictus* (Milne-Edwards, 1853). *Open Journal of Ecology* 3: 161–163.

- Segadilha J, Silva-Soares T. 2015. Necrophagy on *Rhinella ornata* (Anura: Bufonidae) by the crab *Trichodactylus fluviatilis* (Crustacea: Trichodactylidae) in Atlantic Rainforest mountains of state of Rio de Janeiro, southeastern Brazil. *Herpetology Notes* 8: 429–431.
- Senkman LE, Negro CL, Lopretto EC, Collins PA. 2015. Reproductive behaviour of three species of freshwater crabs of the family Trichodactylidae (Crustacea: Decapoda) including forced copulation by males. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 48: 77–88.
- Silva LS, Martinelli-Lemos JM, Ferreira MAP, Rocha RM. 2012. Gonadal development in the freshwater crab *Sylviocarcinus pictus* (H. Milne Edwards, 1853) (Brachyura: Trichodactylidae) from the Guamá River, State of Pará, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 84: 789–798
- Silveira R, Magnusson WE. 1999. Diets of spectacled and black caiman in the Anavilhanas Archipelago, Central Amazonia, Brazil. *Journal of Herpetology* 33: 181–192.
- Sternberg R, Cumberlidge N. 2003. Autapomorphies of the endophragmal system in trichodactylid freshwater crabs (Crustacea: Decapoda: Eubrachyura). *Journal of Morphology* 256: 23–28.
- Stevcic Z. 1971. The main features of brachyuran evolution. *Systematic Zoology* 20: 331–340.
- Torres MV, Giri F, Williner V. 2012. Size selective predation on an invasive bivalve, *Limnoperna fortunei* (Mytilidae), by a freshwater crab, *Zilchiopsis collastinensis* (Trichodactylidae). *Journal of Crustacean Biology* 32: 698–710.
- Tsang LM, Schubart CD, Ahyong ST, Lai JCY, Au EYC, Chan TY, Ng PKL, Chu KH. 2014. Evolutionary history of true crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) and the origin of freshwater crabs. *Molecular Biology and Evolution* 31: 1173–1187.

- Vieira RRR, Rieger PJ, Cichowski V, Pinheiro MAA. 2013. Juvenile development of *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861 (Brachyura, Trichodactylidae) reared in the laboratory, with emphasis on setae morphology. *Crustaceana* 86: 1644–1663.
- Vogt G. 2013. Abbreviation of larval development and extension of brood care as key features of the evolution of freshwater Decapoda. *Biological Reviews* 88: 81–116.
- Wehrtmann IS, Magalhães C, Bello-González OC. 2016. First confirmed report of a primary freshwater crab (Brachyura: Pseudothelphusidae) associated with bromeliads in the Neotropics. *Journal of Crustacean Biology* 36: 303–309.
- Yeo DCJ, Ng PKL, Cumberlidge N, Magalhaes C, Daniels SR, Campos MR. 2008. A global assessment of freshwater crab diversity (Crustacea: Decapoda: Brachyura). *Hydrobiologia* 595: 275–286.
- Zara FJ, Toyama MH, Caetano FH, López-Greco LS. 2012. Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue crab, *Callinectes danae* (Portunidae). *Journal of Crustacean Biology* 32: 249–262.

# Capítulo I

**Morfologia do sistema reprodutor masculino, espermatogênese e produção de fluido seminal em *Dilocarcinus pagei* e *Sylviocarcinus pictus* (Decapoda: Trichodactylidae): existe formação de “plug” ou pacote espermático em caranguejos de água doce?**

Leo Jaime Filgueira de Oliveira, Fernando José Zara

Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology*

**Morfologia do sistema reprodutor masculino, espermatogênese e produção de fluido seminal em *Dilocarcinus pagei* e *Sylviocarcinus pictus* (Decapoda: Trichodactylidae): existe formação de “plug” ou pacote espermático em caranguejos de água doce?**

Leo Jaime Filgueira de Oliveira; Fernando José Zara

Universidade Estadual Paulista (FCAV/UNESP), Centro de Aquicultura (CAUNESP) e Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML) - Departamento de Biologia Aplicada (DBAA) - Via de Acesso Prof. Donato Castellane, S/N, Jaboticabal, SP, CEP: 14884-900, Brasil.

E-mail:

LJFO leojfo@gmail.com – autor correspondente

FJZ fjzara@gmail.com

**Agradecimentos**

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de pós-graduação (#134523/2015-6) concedido a LJFO, CAPES Ciências do Mar (CIMAR) II (Proc. #1989/2014) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. #2010/50188-8 e 2016/25344-2) concedidos a FJZ. À Márcia F. Mataqueiro pelo suporte técnico e ao Grupo de Pesquisa em Biologia e Produção de Organismos Aquáticos Amazônicos do ICET/UFAM coordenados por Gustavo Yomar Hattori e Bruno Sampaio Sant’Anna pelo auxílio nas coletas e cuidados com os animais. Ao Bruno Sampaio Sant’Anna pela leitura crítica que contribuiu significativamente para este manuscrito.

## Resumo

No presente estudo foram descritos e comparados o sistema reprodutor masculino e espermatogênese dos caranguejos de água doce *Sylviocarcinus pictus* e *Dilocarcinus pagei* por meio da anatomia, histologia, histoquímica e a atuação deste durante a cópula. Os animais foram dissecados e o sistema reprodutor masculino processado segundo rotina histológica. Adicionalmente, experimentos de transferência espermática com cópulas sequenciais foram realizados e a anatomia do receptáculo seminal foi verificada. A anatomia do sistema reprodutor masculino de ambas espécies apresenta formato de “U” invertido, unido pelos testículos, de onde partem o par de vasos deferentes. Ao microscópio de luz, os testículos mostram-se do tipo tubular modificado, com regiões apresentando células em um mesmo estágio de meiose. O vaso deferente é dividido em regiões: anterior (AVD), subdividida em porções proximal (AVDp) e distal (AVDd); média (MVD) e posterior (PVD). A AVDp apresenta secreção glicoproteica basófila onde estão imersos os espermatozoides. Os espermatóforos coenospérmicos são formados na AVDd e são encaminhados para a MVD, onde a secreção luminal é glicoproteica granular. A PVD apresenta glândulas acessórias ricas em secreção glicoproteica e fluida em *S. pictus* e mesmas características histoquímicas, porém em maior quantidade em *D. pagei*. Em ambas espécies a PVD não apresenta espermatóforos. *Sylviocarcinus pictus* e *D. pagei* apresentam coenospermia, diferindo das famílias de caranguejos de água doce do sudeste asiático, os quais são em sua maioria cleistospermeicos ou livres. A composição histoquímica do fluido seminal é similar em ambos Trichodactylidae avaliados, seguindo o padrão descrito para a maioria dos Brachyura. Por meio do experimento de cópula e verificação anatômica dos receptáculos seminais, estes animais não formam “plug” espermático, porém formam pacotes espermáticos distintos quando em múltiplas cópulas com machos diferentes.

**Palavras-chave:** cópula; espermatóforo; histologia; histoquímica; transferência espermática.

**Abstract**

In this study, the male reproductive system of Amazon freshwater crabs *Sylviocarcinus pictus* and *Dilocarcinus pagei* were described and compared by means of anatomy, histology, histochemistry and their proceeding during the copulation. The animals were dissected and the male reproductive system was processed according to histological routine. In addition, sperm transfer experiments with sequential copulations were performed and the anatomy of the seminal receptacle was checked. The anatomy of the male reproductive system of both species is an inverted "U" shape, connected by the testes, from which the pair of vas deferens depart. Under the light microscope, the testicles are of the modified tubular type, with regions presenting cells in the same stage of meiosis. The vas deferens is divided into anterior (AVD), subdivided into proximal (AVDp) and distal (AVDd) portions; medial (MVD) and posterior (PVD). The AVDp presents basophilic glycoprotein secretion where the spermatozoa are immersed. The coenospermic spermatophores are formed in the AVDd and are sent to the MVD, where the luminal secretion is granular glycoprotein. The PVD exhibits accessory glands rich in fluid glycoprotein secretion in *S. pictus* and the same histochemical characteristics, but in bigger amount in *D. pagei*. In both species the PVD does not present spermatophores. *Sylviocarcinus pictus* and *D. pagei* show coenospermia, differing from the families of freshwater crabs in Southeast Asia, which are mostly cleistospermic or have free spermatozoa in VD. The histochemical composition of the seminal fluid is similar in both Trichodactylidae evaluated, following the pattern described for most Brachyura. Through the experiments of copulation and anatomical verification, these animals do not form a spermatic plug, but form different spermatic packets when in multiple copulations with different males.

**Keywords:** copulation; histochemistry; histology; spermatophore; sperm transfer.

## **Introdução**

O conhecimento sobre a morfologia do sistema reprodutor masculino de caranguejos hololimnéticos está concentrada sobre animais das superfamílias Gecarcinucoidea (Klaus et al. 2009; Klaus et al. 2011; Bandral et al. 2015) e Potamoidea (Guinot et al. 1997; Scalici et al. 2010; Klaus & Brandis 2011) que ocorrem predominantemente na Ásia e África. Neste contexto, nota-se uma lacuna sobre braquíuros dulcícolas das superfamílias Pseudothelphusoidea e Trichodactyloidea, nativas das américas.

Em geral, o sistema reprodutor masculino em Brachyura é composto por um par de testículos unidos por uma comissura transversal, com formato de “H” dispostos dorsalmente no cefalotórax (López-Greco 2013) e ligados a um par de vasos deferentes (VD) divididos em três regiões: anterior (AVD), média (MVD) e posterior (PVD) (Diesel 1989; Krol et al. 1992). Os testículos localizam-se na margem cefalotorácica anterior e podem ser histologicamente classificados em dois tipos: lobular e tubular (Nagao & Munehara 2003). Nos testículos do tipo lobular, cada lóbulo testicular apresenta células germinativas em um mesmo ou sucessivos estágios de meiose e um ducto seminífero (Simeó et al. 2009; Zara et al. 2012; Nascimento & Zara 2013). Já os testículos do tipo tubular apresentam uma zona germinativa preenchida por espermatogônias, uma zona de transformação com espermátócitos e/ou espermátides e uma zona de evacuação preenchida por espermatozoides prontos a serem enviados para o VD (Simeó et al. 2009; Tiseo et al. 2014). Dentre os tipos de testículos descritos para Brachyura, o mais comum é o do tipo lobular (Diesel et al. 1989; Simeó et al. 2009; Zara et al. 2012).

Após serem produzidos nos testículos, os espermatozoides são enviados para a AVD, onde ocorre a formação dos espermatóforos a partir de secreções liberadas pelo epitélio (Nagao & Munehara 2003; Castilho et al. 2008; Zara et al. 2012; Tiseo et al. 2014). Entre as espécies de Brachyura, o empacotamento de espermatozoides em espermatóforos pode ocorrer de duas maneiras: coenospermia - vários espermatozoides em um único espermatóforo; cleistospermia

- um espermatozoide em cada espermatóforo como no único gênero europeu, *Potamon Savigny*, 1816 (Guinot et al. 1997). A presença de ambos os tipos de formação de espermatóforos foi descrita para Brachyura em espécies que vivem desde o ambiente marinho até o ambiente de água doce (Guinot et al. 1997; Klaus & Brandis 2011; Tiseo et al. 2014). Na MVD ocorre a liberação de secreções componentes do fluido seminal, que juntamente com o restante da secreção da AVD, armazenam grande quantidade de espermatóforos (Johnson 1980; Jivoff et al. 2007; Sal Moyano et al. 2009; Zara et al. 2012). Já a PVD, é caracterizada pela presença de bolsas laterais ou glândulas acessórias responsáveis pela produção de fluido seminal, diferente do conteúdo produzido no lúmen do vaso deferente (Johnson 1980; Zara et al. 2012; Tiseo et al. 2014). Estas glândulas podem ocorrer ao mesmo tempo na MVD e PVD (Zara et al. 2012), ou somente na PVD, como descrito para outros braquiúros marinhos, com função de formação de “plug” espermático, cuja função é selar o receptáculo seminal, prevenindo que outros machos copulem com a fêmea inseminada (Beninger et al. 1988; Garcia & Silva 2006; Castilho et al. 2008; Simeó et al. 2009).

Informações a respeito da biologia reprodutiva, mais especificamente sobre morfologia do sistema reprodutor de caranguejos dulcícolas podem auxiliar o entendimento da transferência espermática e o consequente sucesso dos machos na competição reprodutiva e perpetuação das espécies (Subramoniam 1993; Rondeau & Sainte-Marie 2001). Além disso, dados sobre a morfologia dos espermatozoides e o tipo de empacotamento espermático podem ser importantes ferramentas em estudos taxonômicos sobre crustáceos decápodes (Diesel 1990; Guinot et al. 1997; Tudge 1997; Klaus et al. 2009; Klaus & Brandis 2011; Camargo et al. 2015). Assim, o objetivo do presente estudo foi descrever e comparar a morfologia do sistema reprodutor masculino de *Sylviocarcinus pictus* H. Milne Edwards, 1853 e *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861 e, quanto a formação dos espermatóforos e características bioquímicas do

fluido seminal. Adicionalmente, identificar se existe a formação de “plug” espermático ou pacotes espermáticos nos receptáculos seminais das fêmeas utilizando o *D. pagei* como modelo.

## Material e Métodos

Os exemplares de *S. pictus* foram coletados manualmente em janeiro de 2015, no período noturno em poças de igarapés próximas ao Rio Juruena (09°51'26,23"S, 58°14'57,43"O), município de Cotriguaçu (MT). Os animais foram mantidos em aquários, aclimatados e alimentados até o momento da dissecação em laboratório.

Os espécimes de *D. pagei* foram capturados manualmente em setembro de 2015, no período noturno no Lago da Poranga, Município de Itacoatiara (AM) (03°07'11,10"S, 58°27'13,0"O), durante o período de seca do Rio Amazonas. Os animais coletados foram transportados em caixas com vegetação do local para o Laboratório de Zoologia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas (ICET/UFAM).

Para ambas espécies, somente machos com carapaça em estágio de intermuda foram anestesiados e eutanasiados por choque-térmico a -20°C, por aproximadamente 5 min. O sistema reprodutor masculino de 3 exemplares de *S. pictus* e 5 de *D. pagei* foram removidos e fixados em solução de paraformaldeído 4% em tampão fosfato de sódio a 0,2 mol.L<sup>-1</sup> (pH 7,4) por de 24 a 48 h. O material dissecado imerso em solução fixadora foi fotografado em estereomicroscópio acoplado a um sistema de captação de imagem IM50 Leica Systems®, para descrição anatômica. Posteriormente, o sistema reprodutor foi seccionado de acordo com as diferentes regiões anatômicas, lavados no mesmo tampão, desidratados em concentrações crescentes de etanol (70-95%), embebidos e incluídos em historesina Leica® (glicol metacrilato), de acordo com as recomendações do fabricante. Após a polimerização, os blocos foram cortados em micrótomo Leica RM2245. Cortes seriados com espessura de 4 a 6 µm, montados em lâminas e corados com Hematoxilina e Eosina (HE) para descrição histológica

geral (Junqueira & Junqueira 1983, modificado), evitando baterias de xilol (Sant'Anna et al. 2010).

Para descrição histoquímica, lâminas do sistema reprodutor masculino de ambas espécies foram coradas com Xylidine ponceau para caracterização de proteínas (Mello & Vidal 1980). A presença de polissacarídeos neutros e ácidos foi testada com a utilização do PAS e Azul de Alcian (pH 2,5), respectivamente (Junqueira & Junqueira 1983). As lâminas foram fotografadas com sistema de captação de imagem IM50 Leica Systems®.

Foram selecionadas lâminas coradas com azul de toluidina pH 4,0 de pelo menos três indivíduos diferentes para medida dos núcleos de células germinativas seguindo os protocolos estabelecidos por Zara et al. (2012). Em cada lâmina foram mensurados os diâmetros maiores de 10 núcleos de células germinativas em cada estágio (N = 30 por estágio germinativo) utilizando o software Leica® IM50. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e teste de homocedasticidade de Bartlett. Posteriormente os dados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey (Zar 2010) para comparar as médias dos diâmetros nucleares entre os estágios. Para todos os dados foi adotado o nível de significância de  $p < 0,05$ .

Para testar se o sistema reprodutor masculino produz fluido seminal o qual pode atuar como “plug” espermático, pacote espermático ou simplesmente veículo de transferência de espermatozoides, fêmeas de *D. pagei* foram coletadas no mesmo local dos machos. As fêmeas foram aclimatadas por três dias em aquários (70x50 cm) devidamente aerados e com alimentação adequada. Foram selecionadas nove fêmeas, as quais foram divididas em três tratamentos: I) fêmeas que copularam com um único macho, e estes foram mantidos juntos para identificar se ocorreria nova cópula; II) fêmeas que copularam com um macho e em seguida, após o término da primeira cópula, o primeiro foi retirado e foi introduzido um segundo macho; III) fêmeas que copularam sequencialmente com três machos diferentes. Cada tratamento foi

realizado em três réplicas. O repertório comportamental pré-cópula e duração da cópula (tempo em que o macho ficou aderido à fêmea em minutos) (Senkman et al. 2015), foram registrados e filmados por meio de câmera digital. Após os experimentos, os receptáculos seminais das fêmeas foram removidos, mantidos em fixador paraformaldeído 4% para serem analisados e fotografados sob estereomicroscópio.

## **Resultados**

### ***Anatomia***

O sistema reprodutor masculino de ambas espécies está localizado na região dorsal da cavidade cefalotorácica, abaixo do ceco gástrico (Figura 1A e B). Este sistema é bilateral e consiste em um par de testículos e um par de vasos deferentes que em conjunto apresentam formato de “U” invertido (Figura 1C). Os testículos são compostos por túbulos seminíferos convolutos de coloração branca opaca e se conectam na região da linha média do cefalotórax (Figura 1C e D). O vaso deferente possui coloração branca devido a presença de secreções do fluido seminal (Figura 1D), e é dividido em três regiões: AVD, MVD e PVD (Figura 1D-G). A AVD possui forma tubular convoluta, preenchido por fluido seminal esbranquiçado e com calibre relativamente menor que as duas regiões posteriores (Figura 1D e E). A MVD é convoluta, com calibre relativamente maior que a AVD e menor que a PVD, e também apresenta secreção seminal de coloração esbranquiçada (Figura 1D e F). A PVD é convoluta, apresenta numerosas bolsas laterais saculiformes, que são glândulas acessórias, contendo fluido seminal de coloração esbranquiçada (Figura 1D e G).

### ***Histologia e histoquímica***

#### ***Dilocarcinus pagei***

Os testículos são do tipo tubular modificado, nos quais cada região do túbulo apresenta células germinativas em um mesmo estágio de meiose (Figuras 2A-H). Os túbulos são delimitados por células acessórias e unidos entre si por tecido conjuntivo. As células acessórias apresentam morfologia de achatada a elipsoide (Figura 2A-H). Nas regiões dos túbulos onde a espermatogênese está em estágio mais avançado (regiões contendo espermatídes), as células acessórias apresentam núcleos maiores em relação às regiões tubulares contendo espermatogônias e espermatócitos (Figura 2A-H).

Durante a espermatogênese, o diâmetro nuclear das células germinativas diminuíram significativamente ao longo do seu desenvolvimento com aumento em espermatídes tardias e novamente diminuição em espermatozoides ( $F = 393,132$ ;  $DF = 6$ ;  $p < 0,0001$ ). A espermatogênese inicia-se nos centros germinativos dos túbulos seminíferos com a proliferação de espermatogônias. As espermatogônias possuem citoplasma reduzido, seus núcleos com média de diâmetro de  $16,47 \pm 1,42 \mu\text{m}$  ocupam a maior parte da célula e foram moderadamente corados em azul de toluidina pH 4,0 (Figura 2B). Assim como as espermatogônias, espermatócitos primários e secundários ocupam toda extensão de uma região do túbulo germinativo (Figura 2C e D). Espermatócitos primários apresentam núcleo com diâmetro médio de  $14,43 \pm 0,82 \mu\text{m}$ , cromatina com aspecto granular e menores em relação aos núcleos das espermatogônias ( $p < 0,01$ ) (Figura 2C). Os espermatócitos secundários possuem núcleos menores (diâmetro médio de  $12,02 \pm 1,07 \mu\text{m}$ ) que os espermatócitos primários ( $p < 0,01$ ), cromatina com aspecto granular fortemente corada ao azul de toluidina pH 4,0 (Figura 2D).

Na espermiogênese, as espermatídes iniciais apresentam núcleos esféricos, com diâmetro médio de  $8,69 \pm 0,68 \mu\text{m}$  e ocorre o início da formação da vesícula proacrossomal (Figura 2E) que são menores que os espermatócitos secundários ( $p < 0,01$ ). As espermatídes iniciais apresentam uma peculiaridade em relação aos outros estágios, pois a cromatina tende a formar um anel, ocupando a periferia de seu núcleo, sendo fortemente reativa ao azul de

toluidina pH 4,0 e centro menos reativo ao mesmo corante (Figura 2E). As espermátides intermediárias são caracterizadas pelos núcleos em formato de “D” (Figura 2F) com diâmetro médio de  $8,60 \pm 0,64 \mu\text{m}$  e diâmetro nuclear sem diferença significativa do estágio anterior ( $p > 0,05$ ). Esta morfologia nuclear ocorre devido ao desenvolvimento da vesícula proacrossomal evidente com  $\alpha$ -metacromasia, com grande quantidade de polissacarídeos neutros (Figura 2F-G). Os núcleos das espermátides tardias com diâmetro médio de  $9,78 \pm 0,90 \mu\text{m}$  é maior que os núcleos das espermátides iniciais e intermediárias ( $p < 0,01$ ). Neste estágio, o núcleo é delgado e apresenta forma de “C”, constituindo uma taça na qual se insere a vesícula acrossomal  $\alpha$ -metacromática, constituída por polissacarídeos neutros, mais evidente que no estágio anterior (Figura 2H e I). Os espermatozoides são caracterizados pelo núcleo fortemente corado em azul de toluidina pH 4,0, recobrando a maior parte do acrossomo em  $\alpha$ -metacromasia fortemente PAS-positivo (Figura 2J e K). Os espermatozoides apresentam diâmetro médio do núcleo de  $7,97 \pm 0,50 \mu\text{m}$  menor que os três estágios de espermátides ( $p < 0,01$ ).

Após serem produzidos nos testículos, os espermatozoides chegam à zona de evacuação (Figura 2A), para então serem transportados até a AVD (Figura 3A), que está dividida em porções proximal (AVDp) e distal (AVDd). A AVDp apresenta epitélio colunar simples, uma camada muscular delgada intermediária e uma camada externa de tecido conjuntivo (Figura 3A). No lúmen desta porção, os espermatozoides estão livres e imersos em uma secreção basófila, moderadamente positiva para proteínas e fortemente positiva para polissacarídeos neutros (Figura 3A-C). Na AVDd, o epitélio é similar ao da AVDp, conectado a uma camada muscular relativamente mais espessa que a presente na AVDp e tecido conjuntivo (Figura 3D). Na AVDd, os espermatozoides estão agrupados em espermatóforos, separados da secreção luminal fracamente acidófila, fortemente positiva para proteínas e fracamente positiva para polissacarídeos neutros (Figura 3D-F). Os espermatóforos apresentam

parede glicoproteica, e a secreção formadora do espermátóforo é fracamente acidófila, com reação fracamente positiva para proteínas e polissacarídeos neutros (Figura 3E-I).

Após a AVDd, encontra-se a MVD que é um túbulo convoluto relativamente mais longo e de maior calibre que a AVD. Esta região apresenta epitélio colunar simples com núcleos irregulares, recoberto por uma camada muscular delgada, porém mais espessa que aquelas identificadas na AVD (Figura 3G). A secreção luminal desta região é diferente da secreção produzida na AVD, sendo granular, acidófila, fortemente reativa para proteínas e fracamente positiva para polissacarídeos neutros (Figura 3G-I). Nesta região os espermátóforos mostram-se esféricos, com parede irregular glicoproteica e seu interior fracamente positivo para proteínas e polissacarídeos neutros (Figura 3G-I). Esta região também não apresentou secreções com reação positiva para polissacarídeos ácidos, exceto por aquelas detectadas nos núcleos dos espermatozoides (Figura 3J).

A PVD é caracterizada pela presença de inúmeras glândulas acessórias. Ao contrário da MVD, a PVD apresenta epitélio pavimentoso simples, revestida com camada muscular e tecido conjuntivo semelhante a MVD (Figura 3K). A secreção no lúmen da PVD é composta de grânulos diminutos, diferente da MVD (Figura 3K-M). As glândulas acessórias apresentam secreção com grânulos menores, com aspecto mais fluido em relação a secreção luminal da MVD, composta principalmente por polissacarídeos neutros e proteínas (Figura 3K-M). Na PVD não foram encontrados espermátóforos, sendo esta região composta basicamente por secreções do fluido seminal. O sistema reprodutor masculino de *D. pagei* não apresentou reação para polissacarídeos ácidos.

### *Sylviocarcinus pictus*

Esta espécie apresenta testículo do tipo tubular modificado, com células germinativas em um mesmo estágio de meiose em um túbulo (Figura 4A-H). Cada túbulo é delimitado por células

acessórias, e do lado externo, recoberta por tecido conjuntivo unindo os túbulos entre si (Figuras 4A). As células acessórias apresentam maior tamanho em túbulos onde a espermatogênese está em estágio avançado (Figura 4A-H).

O diâmetro nuclear das células germinativas diminuiu significativamente durante a espermatogênese ( $F = 827,344$ ;  $DF = 6$ ;  $p < 0,0001$ ), aumentando nos estágios de espermatídes tardias e espermatozoides. As espermatogônias apresentam núcleo ocupando a maior proporção da célula, com reação homogênea na cromatina para o azul de toluidina pH 4,0 (Figura 4B). Estas células apresentaram diâmetro nuclear médio de  $19,11 \pm 1,76 \mu\text{m}$ . Os espermatócitos primários apresentaram diâmetro nuclear médio de  $15,11 \pm 1,07 \mu\text{m}$ , sendo significativamente menor que os núcleos das células germinativas do estágio anterior ( $p < 0,01$ ). Neste estágio, os núcleos em prófase apresentam cromatina com aspecto variável da condensação cromossômica, sendo observadas as figuras meióticas típicas, como paquíteno. O núcleo ocupa menor volume da célula, em relação às espermatogônias (Figura 4C). Os núcleos de espermatócitos secundários apresentaram diâmetro médio de  $13,30 \pm 1,08 \mu\text{m}$ , sendo menores que o estágio anterior ( $p < 0,01$ ). Os núcleos destas células foram fortemente corados em azul de toluidina pH 4,0 devido condensação da cromatina (Figura 4D).

Durante a espermiogênese, os núcleos das espermatídes iniciais apresentam forma de anel, com a cromatina fortemente corada ocupando a periferia do núcleo e centro fracamente reativo ao azul de toluidina pH 4,0 (Figura 4E). O diâmetro nuclear médio das espermatídes iniciais ( $7,47 \pm 0,39 \mu\text{m}$ ) foi significativamente menor que os estágios anteriores ( $p < 0,01$ ). As espermatídes intermediárias apresentaram núcleo homogêneo em forma de “D”, fortemente corado em azul de toluidina e vesícula proacrossomal evidente, fortemente PAS-positiva (Figura 4F e G). A média do diâmetro nuclear neste estágio foi  $6,69 \pm 0,38 \mu\text{m}$ , significativamente menor que os estágios anteriores ( $p < 0,01$ ). O núcleo em forma de “C” das espermatídes tardias formam um capuz sobre a vesícula proacrossomal, a qual está mais

desenvolvida e ainda rica em polissacarídeos neutros (Figura 4H e I). O diâmetro médio das espermatídes tardias ( $9,11 \pm 0,65 \mu\text{m}$ ) foi maior que das espermatídes intermediárias ( $p < 0,01$ ). Já na zona de evacuação, os espermatozoides apresentaram núcleos fortemente corados em azul de toluidina pH 4,0 e acrossomo  $\alpha$ -metacromático, fortemente PAS-positivo (Figura 4J). O diâmetro médio do núcleo dos espermatozoides ( $9,79 \pm 0,70 \mu\text{m}$ ) foi significativamente maior que o das espermatídes intermediárias e tardias ( $p < 0,01$ ).

Os espermatozoides chegam à zona de evacuação (Figura 4A), para serem enviados para a AVD, dividida em porções proximal (AVDp) e distal (AVDd) (Figura 5A-F). A AVDp apresenta epitélio colunar simples, recoberto por uma delgada camada muscular e tecido conjuntivo (Figura 5A). Na AVDp os espermatozoides estão livres, imersos em secreção basófila e fracamente glicoproteica (Figura 5A-C). Os espermatozoides encontram-se empacotados e envoltos por parede glicoproteica, formando os espermatóforos na AVDd (Figura 5D). Esta região apresenta epitélio colunar simples com núcleos irregulares, com secreção acidófila e glicoproteica (Figura 5D-F).

A MVD apresenta epitélio colunar simples com núcleos basais irregulares, revestido por delgada camada muscular e unida por tecido conjuntivo (Figura 5G). Os espermatóforos são armazenados na MVD em secreção granular acidófila reativa para proteínas e polissacarídeos neutros (Figura 5G-I). A parede dos espermatóforos possui característica glicoproteica, com reação fracamente positiva para proteínas e polissacarídeos neutros (Figura 5H e I).

A PVD é convoluta, possui epitélio cúbico colunar simples, revestido por uma camada muscular delgada e tecido conjuntivo (Figura 5J). Foram detectados poucos espermatóforos na PVD de *S. pictus* (Figura 5J). As glândulas acessórias apresentam epitélio cúbico simples e uma delgada camada muscular (Figura 5K e L). As glândulas acessórias apresentaram pequena quantidade de secreção com grânulos diminutos e homogênea com característica acidófila,

positivas para proteínas e polissacarídeos neutros (Figura 5K e L). Nenhuma das regiões do sistema reprodutor masculino de *S. pictus* apresentou reação para polissacarídeos ácidos. O resumo dos resultados histoquímicos para o vaso deferente e espermatóforos das duas espécies encontram-se na Tabela 1.

### ***Experimento de transferência espermática***

A cópula dos casais formados de *D. pagei* ocorreu em período de intermuda, ou seja, com carapaça rígida, e teve duração média de  $8 \pm 2$  min (Figura 6A), independente do macho ser o primeiro, segundo ou terceiro a copular. Durante a cópula não houve padrão de posicionamento dos machos em relação a fêmea, e os machos mantidos juntos das fêmeas não realizaram mais de uma cópula. Os receptáculos seminais das fêmeas que realizaram uma cópula apresentaram massa espermática homogênea de coloração esbranquiçada (Figura 6B). Em nenhum dos receptáculos seminais das fêmeas analisadas neste estudo foi encontrada evidência de formação de “plug” espermático, confirmado pela cópula subsequente com um segundo e um terceiro macho. No experimento com a introdução de um segundo macho, a fêmea exibiu comportamentos de evitação de cópula. O tempo em que a fêmea evitava o segundo macho, com comportamentos erráticos foi de  $72 \pm 26$  min. Após este período o segundo macho conseguiu realizar a cópula. Neste grupo experimental, houve a formação de dois pacotes espermáticos claramente separados no interior do receptáculo seminal (Figura 6C). No grupo em que as fêmeas foram colocadas sequencialmente com um terceiro macho, o comportamento de evitação foi bastante curto, em média de  $3 \pm 1$  min. Nestas fêmeas, o receptáculo seminal apresentou três massas espermáticas esbranquiçadas distintas (Figura 6D).

## **Discussão**

Anatomicamente, o sistema reprodutor masculino de *D. pagei* e *S. pictus* apresenta um padrão diferente do comumente encontrado em Brachyura. Ambas espécies possuem sistema reprodutor masculino em formato de “U” invertido, sendo esta pela primeira vez descrita e provavelmente padrão para Trichodactylidae. A anatomia do sistema reprodutor masculino da maioria dos Brachyura apresenta o formato “H”, nos quais os testículos são conectados entre si por uma comissura transversal (López-Greco 2013).

Os testículos e vaso deferente com coloração esbranquiçada são característicos de animais em estágio reprodutivo maduro (Benhalima & Moriyasu 2000; Silva et al. 2012; Zara et al. 2012). Nas duas espécies, o vaso deferente apresentou variações nos diâmetros internos de cada região. Este fato está relacionado com as funções específicas de cada região, sendo a AVD com menor diâmetro interno e função de produzir secreções formadoras de espermatóforos, MVD e PVD com maiores diâmetros internos, responsáveis pelo armazenamento de espermatóforos e pela produção de secreções complementares do fluido seminal, respectivamente (Adiyodi & Anilkumar 1988; Diesel 1989; Krol et al. 1992; Sal Moyano et al. 2009; Zara et al. 2012).

Em *D. pagei* e *S. pictus* foram ainda encontradas glândulas acessórias na PVD, similares ao reportado para *Maja brachydactyla* Balss 1922. Entretanto, esta última espécie apresenta também glândulas na MVD, o que não foi encontrado nos Trichodactylidae analisados. Inachidae Samouelle, 1819 (Diesel 1989) e Portunidae Rafinesque, 1815 (Zara et al. 2012; Nascimento & Zara 2013) também apresentam glândulas acessórias bem desenvolvidas. Nos Portunidae *Callinectes danae* Smith, 1869 e *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 também foram encontradas estas glândulas na MVD (denominadas de bolsas externas), porém estas espécies apresentam as glândulas mais desenvolvidas que em *D. pagei* e *S. pictus*. Este volume de secreção em Portunidae está relacionado a formação de “plug” espermático (Zara et al. 2012; Nascimento & Zara 2013; Zara et al. 2014), o que não ocorre em

Trichodactylidae, uma vez que as fêmeas, apesar do comportamento de evitação, receberam material espermático de mais de um macho, levando assim à formação de pacotes espermáticos no interior dos receptáculos seminais. A formação de pacotes espermáticos em condições naturais pode ser rara, ou mesmo ausente, tendo em vista o longo comportamento de evitação da fêmea, indicando que a mesma, após a cópula se afasta do macho. Assim, provavelmente a fêmea deverá buscar refúgio, sendo uma segunda cópula somente provável caso ocorra um encontro acidental com um segundo macho. Todavia, o experimento demonstra que o receptáculo seminal tem capacidade de armazenar mais de uma carga de fluido seminal, com formação de pacotes.

Histologicamente, os testículos de ambas espécies analisadas são do tipo tubular, porém modificado, onde cada região apresenta células germinativas em um mesmo estágio de meiose, sendo este o padrão mais similar ao testículo do tipo lobular (Minagawa et al. 1994). O testículo do tipo tubular típico deveria apresentar, numa mesma secção transversal, três zonas distintas: a germinativa, onde encontram-se espermatogônias; zona de transformação, onde ocorrem espermatócitos e espermátides; e zona de evacuação, para onde os espermatozoides são enviados ao final da espermatogênese, como encontrado em alguns Majoidea, Grapsoidea e Xanthoidea (Simeó et al. 2009; Tiseo et al. 2014). Tanto em *D. pagei*, quanto em *S. pictus*, os testículos apresentam células acessórias que variam em tamanho de acordo com o estágio de produção espermática. O papel das células acessórias é importante durante a espermiogênese de braquiúros, uma vez que fagocitam e degradam o citoplasma residual de espermátides, além de enviarem espermatozoides para os ductos seminíferos (Simeó et al. 2010; Zara et al. 2012).

A redução do diâmetro do núcleo das células reprodutivas tanto em *D. pagei*, quanto em *S. pictus* durante a espermatogênese corrobora estudos sobre outros braquiúros, como observado em Portunidae (Stewart et al. 2010; Zara et al. 2012) e Ucididae Števíć, 2005 (Castilho et al. 2008). A redução do núcleo não foi significativa entre espermátide intermediária

e espermátide tardia em *D. pagei*, e houve diferença entre todos os estágios em *S. pictus*. Ambas espécies apresentaram aumento de espermátide intermediária para espermátide tardia, entretanto, de espermátide intermediária para espermatozoide, em *D. pagei* as células reprodutivas diminuíram, enquanto que em *S. pictus* tiveram aumento de tamanho. Similar aos dados do presente estudo, em Portunidae essa redução é acentuada, porém não constam diferenças entre espermátides e espermatócitos em *C. danae* (Zara et al. 2012), espermatogônia e espermatócitos e entre espermátide intermediária e espermátide tardia em *C. ornatus* (Nascimento & Zara 2013). Seguindo o mesmo padrão, *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) também apresentou redução do diâmetro nuclear durante a espermatogênese (Castilho et al. 2008). Entretanto esta redução no diâmetro nuclear não pode ser entendida como um padrão para Brachyura, uma vez que *M. brachydactyla* não apresenta esta característica durante sua espermatogênese (Simeó et al. 2010).

Durante a espermiogênese, as espermátides iniciais das duas espécies de Trichodactylidae aqui estudadas apresentaram cromatina em forma de anel, ocupando a periferia do núcleo, diferindo do padrão encontrado para *C. danae* (Zara et al. 2012), *C. ornatus* (Nascimento & Zara 2013) e *U. cordatus* (Castilho et al. 2008), nos quais as espermátides iniciais apresentam núcleo com cromatina homoganeamente corada ao azul de toluidina. Ao microscópio de luz, a espermiogênese de *D. pagei* e *S. pictus* apresenta três fases: espermátides primárias, intermediárias e finais, no entanto, estudos sobre a produção espermática de caranguejos tricodactilídeos utilizando microscopia eletrônica de transmissão são recomendados para esclarecer prováveis fases intermediárias, bem como a organização da cromatina durante a espermatogênese (Stewart et al. 2010).

Dos testículos, os espermatozoides são enviados para o vaso deferente onde serão imersos em matriz extracelular formando os espermatóforos. Ambas espécies de tricodactilídeos apresentam AVD constituído por epitélio simples com núcleos irregulares e

camada muscular externa recoberta por tecido conjuntivo, com papel importante durante a formação dos espermatóforos. Esta região assemelha-se a encontrada em Portunidae (Stewart et al. 2010; Zara et al. 2012; Nascimento & Zara 2013), Grapsidae MacLeay, 1838 (Tiseo et al. 2014), Ucididae (Castilho et al. 2008) e Epialtidae MacLeay, 1838 (Sal Moyano et al. 2009; Simeó et al. 2009). Na AVDP ocorre a liberação de secreções basófilas fluidas e glicoproteicas nas quais os espermatozoides estão imersos. Estas secreções possuem papel importante, pois a partir delas ocorrerá a formação de espermatóforos que estarão finalizados na AVDD. Em *D. pagei* e *S. pictus*, a AVDP apresenta secreções com grânulos diminutos e basófilos similar ao encontrado em *C. ornatus* (Nascimento & Zara 2013), e diferente da característica acidófila encontrada em *C. dane* (Zara et al. 2012) e *Pachygrapsus transversus* (Gibbes, 1850) (Tiseo et al. 2014).

No lúmen da AVDP, as secreções de *C. danae* e *C. ornatus* apresentaram conteúdo proteico (Zara et al. 2012; Nascimento & Zara 2013). Em *C. ornatus* os polissacarídeos ácidos estão presentes na AVDP, porém ausentes na AVDD e MVD, sugerindo que a formação da parede dos espermatóforos ocorre somente na presença de polissacarídeos ácidos (Nascimento & Zara 2013). Entretanto, nas duas espécies de trichodactídeos não foram encontrados polissacarídeos ácidos, não sendo necessária a presença deste composto para a formação da parede e maturação dos espermatóforos em Trichodactylidae. Sugerimos que a ausência de polissacarídeos ácidos no fluido seminal pode ser um padrão para Trichodactylidae, entretanto, são necessários estudos sobre outros gêneros para confirmar esta hipótese, uma vez que este componente do fluido seminal pode ser um agente antibacteriano, como proposto para *Scylla serrata* (Forskål, 1775) por Jayasankar & Subramoniam (1999).

*Sylviocarcinus pictus* e *D. pagei* são animais que apresentam coenospermia, diferindo de alguns Potamoidea e Gecarcinucoidea (para revisão, Klaus et al. 2009). Entretanto, os Trichodactylidae podem apresentar ambos os tipos de espermatóforos, descritos para *Z.*

*oronensis* e *V. serrata* por Oliveira & Zara (Capítulo II), como encontrado em Gecarcinucoidea e Potamoidea (Klaus et al. 2009). A parede dos espermatóforos das espécies de tricodactilídeos apresenta constituição glicoproteica, semelhante às encontradas em Portunidae (Zara et al 2012; Nascimento & Zara 2013) e Grapsidae (Tiseo et al. 2014). Em *M. brachydactyla* a parede dos espermatóforos apresenta uma camada externa simples (Simeó et al. 2009), o que difere do encontrado em alguns Potamoidea, que apresenta diversas camadas de matriz extracelular compondo a parede dos espermatóforos (Klaus et al. 2009). A coenospermia ou cleistospermia, bem como a composição química da parede dos espermatóforos, podem estar diretamente relacionadas com a velocidade de sua deiscência no interior do receptáculo seminal (Hinsch 1991; Klaus et al. 2009; Tiseo et al. 2014). Entretanto, estudos envolvendo MET são necessários para demonstrar maiores detalhes das paredes dos espermatóforos das espécies de Trichodactylidae.

A MVD de *D. pagei* e *S. pictus* é um túbulo convoluto de calibre mais acentuado em relação a AVD. Nestas duas espécies não foram encontradas bolsas laterais na MVD, em contraste com o observado em Portunidae (Stewart et al. 2010; Zara et al. 2012; Nascimento & Zara 2013) e Majidae (Simeó et al. 2009). O epitélio da MVD é colunar simples, recoberto por uma camada muscular simples e tecido conjuntivo, similar ao encontrado para o Epialtidae *Libinia spinosa* Guérin, 1832 descrito por Sal Moyano et al. (2009) e *M. brachydactyla* (Simeó et al. 2009), e em alguns Portunidae (Stewart et al. 2010; Zara et al. 2012; Nascimento & Zara 2013) e Ucididae (Castilho et al. 2008). Em *L. spinosa* a musculatura desenvolvida na porção distal da MVD tem função de mobilizar os espermatóforos para a PVD e conseqüentemente para os ductos ejaculatórios (Sal Moyano et al. 2009).

A ausência de glândulas na MVD de Trichodactylidae não parece ser um fator determinante para o acúmulo de secreção seminal, estando ligada mais ao armazenamento de espermatóforos. Os portunídeos diferem neste aspecto dos tricodactilídeos analisados, uma vez

que parte da secreção componente do fluido seminal é produzida por bolsas laterais presentes na MVD (Johnson 1980; Zara et al. 2012). De acordo com os últimos autores, a secreção glicoproteica produzida na MVD de *C. danae* é o principal composto do fluido seminal e está relacionada à manutenção dos espermátóforos no vaso deferente. Em *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius, 1788), as secreções glicoproteicas estão relacionadas à diferenciação de espermátides em espermatozoides (Sainte-Marie & Sainte-Marie 1999), bem como completar a formação dos espermátóforos em *Inachus phalangium* (Fabricius, 1775) demonstrado por Diesel (1989). Tal fato não acontece em Trichodactylidae, nos quais os espermatozoides encontram-se finalizados na zona de evacuação dos testículos e os espermátóforos são completados na porção proximal da AVD.

No lúmen da MVD de *D. pagei* e *S. pictus* são armazenados os espermátóforos recebidos da AVD (Sal Moyano et al. 2009; Simeó et al. 2009), e são adicionados grânulos de secreção acidófilos, como reportado para os Portunidae *C. danae* (Zara et al. 2012) e *C. ornatus* (Nascimento & Zara 2013). Histoquimicamente, os grânulos de secreção produzidos pelo epitélio da MVD apresentaram leves diferenças entre as espécies de Trichodactylidae avaliadas neste estudo. Enquanto *D. pagei* apresentou secreção granular com reação fortemente proteica e PAS-positiva, *S. pictus* apresentou secreção com reação positiva para proteínas e fortemente PAS-positiva, sendo as duas espécies com ausência de polissacarídeos ácidos. Estas secreções glicoproteicas da MVD podem ter função de prevenir a deiscência do espermátóforo ao serem transferidos para os receptáculos seminais das fêmeas (Subramoniam 1991; Benhalima & Moriyasu 2000).

Os espermátóforos na MVD mantiveram a constituição glicoproteica de sua parede, com a modificação da composição da secreção interna tornando-se fracamente PAS-positiva em *D. pagei* e fortemente PAS-positiva em *S. pictus*. Assim, os espermátóforos não têm parede totalmente impermeável ao sair da AVD e tais secreções podem servir como moléculas com

algum valor energético aos espermatozoides (Subramoniam 1991; Benhalima & Moriyasu 2000). Em ambas espécies analisadas neste estudo, há acúmulo de secreções liberadas ao longo do vaso deferente, com maior volume liberado pela PVD. O grande volume de secreção e suas características químicas no vaso deferente em Trichodactylidae pode estar relacionado à formação de pacotes espermáticos e manutenção dos espermatozoides no interior do receptáculo seminal das fêmeas. Em *Ch. opilio*, a secreção da AVD se une à proveniente da PVD no momento da ejaculação, formando um complexo orgânico que pode manter os espermatozoides viáveis por longos períodos no interior dos receptáculos seminais (Beninger et al. 1988).

A PVD dos tricodactídeos analisados neste estudo são túbulos convolutos com inúmeras glândulas acessórias e histologicamente apresentaram diferenças nos epitélios entre as espécies. Em *D. pagei* a PVD mostra-se com epitélio pavimentoso simples, e em *S. pictus* o epitélio é cúbico simples. Ambas as espécies possuem musculatura e tecido conjuntivo, que pode estar envolvida na transferência espermática. *Sylviocarcinus pictus* não apresentou grandes quantidades de secreção na PVD quando comparado a *D. pagei*. Baseado em *D. pagei*, sugerimos que em Trichodactylidae o armazenamento de espermátóforos em animais reprodutivamente maduros ocorre principalmente na MVD, mas também podem ser encontrados em muito pouca quantidade na PVD, similar ao reportado para *L. spinosa* (Sal Moyano et al. 2009). Tais espermátóforos podem ser estruturas ali encontradas provenientes de outras cópulas prévias.

O fluido seminal da PVD de Brachyura apresentam diversas características histoquímicas. A PVD de *D. pagei* produz secreção com grânulos diminutos proteicos e PAS-positivos, diferindo histoquimicamente de *S. pictus*, cuja secreção da PVD é fracamente proteica e PAS-positiva, similar ao que ocorrem em Grapsidae (Tiseo et al. 2014). A secreção produzida na PVD de Trichodactylidae segue o padrão para Portunidae (Zara et al. 2012;

Nascimento & Zara 2013), no entanto, em *Portunus (Portunus) pelagicus* (Linnaeus, 1758) não foram encontradas diferenças entre as secreções da MVD e PVD (Stewart et al. 2010). De acordo Tiseo et al. (2014), a presença de polissacarídeos ácidos na PVD de *P. gracilis* (cleistospérmico) faz com que a deiscência dos espermatóforos ocorra de forma mais rápida que em *P. transversus* (cleistospérmico). Em Portunidae as secreções da PVD são compostas por glicoproteínas neutras (Zara et al. 2012; Nascimento & Zara 2013), já em Grapsidae e Eriphiidae MacLeay, 1838 foram reportados polissacarídeos neutros e ácidos (Garcia & Silva 2006; Tiseo et al. 2014).

O papel do fluido seminal em crustáceos ainda não é bem conhecido, entretanto existem hipóteses de que podem agir como formadores de “plug” espermático para evitar competição reprodutiva com o bloqueio dos gonóporos das fêmeas (Johnson 1980; Diesel 1989, 1991); atividade proteolítica para dissolver o “plug” espermático de outros machos, garantindo uma nova cópula (Jayasankar & Subramoniam 1997); ou ainda garantir nutrientes à sobrevivência dos espermatozoides (Subramoniam 1991). Esta última, associada à outra hipótese de que o fluido seminal age como antibacteriano (Jayasankar & Subramoniam 1999) pode explicar o grande volume do fluido seminal em Trichodactylidae.

Nós mostramos que não há formação de “plug” espermático em *D. pagei*, e provavelmente ocorra o mesmo em outros Trichodactylidae. Apesar de não haver “plug” espermático, há formação de pacotes espermáticos nos receptáculos seminais em fêmeas que copulam duas ou mais vezes. Ainda que um macho preencha o receptáculo seminal das fêmeas, outros machos conseguem realizar cópula e transferir seu material genético, evidenciando a plasticidade morfológica do receptáculo seminal em trichodactilídeos. Este fato ocorre também ocorre nos Platyxanthidae Guinot, 1977, como *Danielethus crenulatus* (A. Milne-Edwards, 1879) investigados por Farias et al. (2017) e nos Inachoididae *Inachus phalangium* Dana, 1851 (Diesel 1989, 1990, 1991), *Stenorhynchus seticornis* (Herbst, 1788) analisados por Antunes et

al. (2016), sendo que este último apresenta diferentes pacotes espermáticos de um mesmo macho. Apesar das evidências da ausência de “plug” espermático em trichodactilídeos, são recomendados estudos histológicos sobre os receptáculos seminais das fêmeas que realizam mais de uma cópula. Com isso, pode-se identificar como ocorre a sobreposição dos pacotes espermáticos de diferentes machos, além de classificar o tipo de receptáculo seminal (ver McLay & López-Greco 2011) e qual macho obtém maior sucesso na fertilização dos ovócitos e consequente transferência genética para a prole.

Em conclusão, o sistema reprodutor masculino de *D. pagei* e *S. pictus* apresentaram padrão anatômico diferente dos demais registrados em Brachyura. A secreção produzida na AVD está relacionada a produção e da MVD ao armazenamento e manutenção dos espermátóforos até o momento da transferência espermática para a fêmea. Apesar da morfologia do sistema reprodutor masculino apresentar características de animais formadores de “plug” espermático, os Trichodactylidae formam pacotes espermáticos dentro dos receptáculos seminais, isto não ocorre, mas sim de pacotes espermáticos em condições experimentais, tendo a PVD e suas inúmeras glândulas acessórias, como maior produtora de secreção seminal glicoproteica.

## Referências

- Adiyodi KG, Anilkumar RG. 1988. Accessory sex glands. In: Adiyodi KG, Adiyodi RG, editors. Reproductive biology of invertebrates. Vol. 3. Kerala: John Wiley and Sons. pp. 261–318.
- Antunes M, Zara FJ, López-Greco LS, Negreiros-Fransozo ML. 2016. Morphological analysis of the female reproductive system of *Stenorhynchus seticornis* (Brachyura: Inachoididae) and comparisons with other Majoidea. *Invertebrate Biology* 135: 75–86.

- 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.
- Benhalima K, Moriyasu M. 2000. Structure and function of the posterior vas deferens of the snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae). *Invertebrate Reproduction & Development* 37: 11–23.
- Beninger PG, Elnor RW, Foyle TP, Odense PH. 1988. Functional anatomy of the male reproductive system and the female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. *Journal of Crustacean Biology* 8: 322–332.
- Camargo TR, Rossi N, Castilho AL, Costa RC, Mantelatto FL, Zara FJ. 2015. 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.
- Castilho GG, Ostrensky A, Pie MR, Boeger WA. 2008. Morphology and histology of the male reproductive system of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (L.) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Acta Zoologica* 89: 157–161.
- 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: 266–277.
- Diesel R. 1990. Sperm competition and reproductive success in the decapod *Inachus phalangium* (Majidae): a male ghost spider crab that seals off rivals' sperm. *Journal of Zoology* 220: 213–223.

- Diesel R. 1991. Sperm competition and mating behaviour in Brachyura. In: Bauer RT, Martin JW, editors. Crustacean sexual biology. New York: Columbia University Press. pp. 145-163.
- Farias NE, Spivak ED, Luppi TA. 2017. Functional morphology of the female reproductive system of a crab with highly extensible seminal receptacles and extreme sperm storage capacity. *Journal of Morphology* 278: 919–935.
- Garcia TM, Silva JRF. 2006. Testis and vas deferens morphology of the red-clawed mangrove tree crab (*Goniopsis cruentata*) (Latreille, 1803). *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49: 339–345.
- Guinot D, Jamieson BGM, Tudge CC. 1997. Ultrastructure and relationships of spermatozoa of the freshwater crabs *Potamon fluviatile* and *Potamon ibericum* (Crustacea, Brachyura, Potamidae). *Journal of Zoology* 241: 229–244.
- Hinsch GW. 1988. Morphology of the reproductive tract and seasonality of reproduction in the golden crab *Geryon fenneri* from the eastern Gulf of Mexico. *Journal Crustacean Biology* 8: 254–261.
- Hinsch GW. 1991. Structure and chemical content of the spermatophores and seminal fluid of reptantian decapods. In: Bauer RT, Martin JW, editors. *Crustacean Sexual Biology*. New York: Columbia University Press. pp 290–307.
- Jayasankar V, Subramoniam T. 1997. Proteolytic activity in the seminal plasma of the mud crab, *Scylla serrata* (Forskål). *Comparative Biochemistry and Physiology* 116: 347–352.
- Jayasankar V, Subramoniam T. 1999. Antibacterial activity of seminal plasma of the mud crab *Scylla serrata* (Forskål). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 236: 253–259.

- Jivoff P, Hines AH, Quackenbush LC. 2007. Reproductive biology and embryonic development. In: Cronin LE, Kennedy VS, editors. The blue crab *Callinectes sapidus*. Maryland Sea Grant College. pp. 255–286.
- Johnson PT. 1980. Histology of the blue crab *Callinectes sapidus*: A model for the Decapoda. New York: Praeger.
- Junqueira LCU, Junqueira LMMS. 1983. Técnicas Básicas de Citologia e Histologia. Santos, São Paulo.
- Klaus S, Brandis D. 2011. Evolution of sperm morphology in potamid freshwater crabs (Crustacea: Brachyura: Potamoidea). Zoological Journal of the Linnean Society 161: 53–63.
- Klaus S, Münzner S, Modenbach AC, Streit B, Tudge CC. 2011. Spermatophore formation and sperm ultrastructure of *Sundathelphusa philippina* (Crustacea: Brachyura: Gecarcinucidae). Acta Zoologica 20: 1–6.
- Klaus S, Schubart CD, Brandis D. 2009. Ultrastructure of spermatozoa and spermatophores of old world freshwater crabs (Brachyura: Potamoidea: Gecarcinucidae, Potamidae, and Potamonautidae). Journal of Morphology 270: 175–193.
- Krol RM, Hawkins WE, Overstreet RM. 1992. Reproductive components. In: Harrison FW, Humes AG, editors. Microscopic anatomy of invertebrates. Vol. 10: Decapoda Crustacea. New York: Wiley-Liss Inc.; p. 295–343.
- López-Greco LS. 2013. Functional anatomy of the reproductive system. In: Watling L, Thiel M, editors. Functional morphology and diversity of the crustaceans. New York: Oxford University Press; pp. 413–450.
- Magalhães C. 2003. Famílias Pseudothelphusidae e Trichodactylidae. In: Melo GAS, editor. Manual de identificação dos Crustacea Decapoda de água doce do Brasil. São Paulo: Editora Loyola; pp. 143–287.

- McLay CL, López-Greco LS. 2011. A hypothesis about the origin of sperm storage in the Eubrachyura, the effects of seminal receptacle structure on mating strategies and the evolution of crab diversity: How did a race to be first become a race to be last? *Zoologischer Anzeiger* 250: 378–406
- Mello MSL, Vidal BC. 1980. *Práticas de biologia celular*. São Paulo: Edgar Blucher – FUNCAMP.
- Minagawa M, Chiu JR, 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.
- 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: 1651–1665.
- Nagao J, Munehara H. 2003. Annual cycle of testicular maturation in the helmet crab *Telmessus cheiragonus*. *Fisheries Science* 69: 1200–1208.
- Nascimento FA, Zara FJ. 2013. Development of the male reproductive system in *Callinectes ornatus* Ordway, 1863 (Brachyura: Portunidae). *Nauplius* 21: 161–177.
- Oliveira LJF, Zara FJ. Ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides de *Dilocarcinus pagei*, *Zilchiopsis oronensis* e *Valdivia serrata* (Crustacea: Decapoda: Trichodactylidae). Capítulo II (presente dissertação).
- Rondeau A, Sainte-Marie B. 2001. Variable mate-guarding time and sperm allocation by male snow crabs (*Chionoecetes opilio*) in response to sexual competition, and their impact on the mating success of females. *Biological Bulletin* 201: 204–217.
- Sainte-Marie G, Sainte-Marie B. 1999. Reproductive products in the adult snow crab (*Chionoecetes opilio*). I. Observations on spermiogenesis and spermatophore formation in the vas deferens. *Canadian Journal of Zoology* 77: 440–450.

- Sal Moyano MP, Gavio MA, Cuartas EI. 2009. Morphology and function of the reproductive tract of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea, Brachyura, Majoidea): pattern of sperm storage. *Helgoland Journal of Marine Research* 64: 213–221.
- Sant'Anna BS, Turra A, Zara FJ. 2010. Simultaneous activity of male and female gonads in intersex hermit crabs. *Aquatic Biology* 10: 201–209.
- Scalici M, Scuderi S, Gibertini G. 2010. Gonad structure in the river crab, *Potamon fluviatile* (Herbst, 1785) (Decapoda, Brachyura). *Crustaceana* 83: 61–72.
- Senkman LE, Negro CL, Lopretto EC, Collins PA. 2015. Reproductive behaviour of three species of freshwater crabs of the family Trichodactylidae (Crustacea: Decapoda) including forced copulation by males. *Marine and Freshwater Behaviour and Physiology* 48: 77–88.
- Silva LS, Martinelli-Lemos JM, Ferreira MAP, Rocha RM. 2012. Gonadal development in the freshwater crab *Sylviocarcinus pictus* (H. Milne Edwards, 1853) (Brachyura: Trichodactylidae) from the Guamá River, State of Pará, Brazil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 84: 789–798.
- Simeó CG, Ribes E, Rotllant G. 2009. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). *Tissue and Cell* 41: 345–361.
- Simeó CG, Kurtz K, Chiva M, Ribes E, Rotllant G. 2009. Spermatogenesis of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). *Journal of Morphology* 271: 394–406.
- Stewart MJ, Stewart P, Soonklang N, Linthong V, Hanna PJ, Duan W, Sobhon P. 2010. Spermatogenesis in the blue swimming crab, *Portunus pelagicus*, and evidence for histones in mature sperm nuclei. *Tissue and Cell* 42: 137–150.

- Subramoniam T. 1991. Chemical composition of spermatophores in decapods crustaceans. In: Bauer RT, Martin JW, editors. Crustacean sexual biology. New York: Columbia University Press. pp. 308–321.
- Subramoniam T. 1993. Spermatophores and sperm transfer in marine crustaceans. In: J.H.S. Blaxter JHS, Southward AJ, editors. Advances in Marine Biology. pp. 129–214.
- Tiseo GR, Mantelatto FL, Zara FJ. 2014. Is cleistosperry and coenospermy related to sperm transfer? A comparative study of the male reproductive system of *Pachygrapsus transversus* and *Pachygrapsus gracilis* (Brachyura: Grapsidae). Journal of Crustacean Biology 34: 704–716.
- Tudge CC. 1997. Phylogeny of the Anomura (Decapoda, Crustacea): spermatozoa and spermatophore morphological evidence. Contributions to Zoology 67: 125–141.
- Zar JH. 2010. Biostatistical analysis. 5th Edn. New Jersey: Pearson Prentice-Hall.
- Zara FJ, Pereira GRR, Sant'Anna BS. 2014. Morphological changes in the seminal receptacle during ovarian development in the speckled swimming crab *Arenaeus cribarius*. The Biological Bulletin 227: 19–32.
- Zara FJ, Toyama MH, Caetano FH, López-Greco LS. 2012. Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue crab, *Callinectes danae* (Portunidae). Journal of Crustacean Biology 32: 249–262.

## Lista de Tabela

Tabela 1. Caracterização histoquímica das secreções seminais do vaso deferente anterior proximal (AVDp) e distal (AVDd), medial (MVD), posterior (PVD) e paredes dos espermátóforos. + = fracamente positivo; ++ = positivo; +++ = fortemente positivo; - = negativo.

Espécie	Secreção	Composto histoquímico		
		Proteínas	Polissacarídeos neutros	Polissacarídeos ácidos
<i>Dilocarcinus pagei</i>	AVDp	+	++	-
	AVDd	+++	+	-
	MVD	++	+	-
	PVD	++	++	-
	Parede do espermátóforo	+++	+++	-
<i>Sylviocarcinus pictus</i>	AVDp	+	+	-
	AVDd	+++	+++	-
	MVD	++	+++	-
	PVD	+	+	-
	Parede do espermátóforo	+++	+++	-

## Lista de Figuras

Figura 1. Anatomia do sistema reprodutor masculino de *Sylviocarcinus pictus* e *Dilocarcinus pagei*.

A, Vista dorsal da disposição interna do sistema reprodutor masculino de *S. pictus*. B-G, Anatomia do sistema reprodutor masculino de *D. pagei*. B, Vista dorsal da disposição interna do sistema reprodutor masculino de *D. pagei*. C, Sistema reprodutor masculino de *D. pagei* completo (bilateral) mostrando testículos e vaso deferente convoluto. D, Vista de um dos lados do sistema reprodutor masculino de *D. pagei* com detalhe para as colorações dos testículos e vaso deferente. Asteriscos indicam as glândulas acessórias localizadas na PVD. E, Detalhe da AVD de *D. pagei*, túbulos convolutos com uma região central esbranquiçada, preenchida por fluidos seminais. F, Detalhe da MVD convoluta de *D. pagei* com coloração esbranquiçada característica dos fluidos seminais e com calibre relativamente maior em relação a AVD. G, Detalhe da PVD de *D. pagei* com glândulas acessórias de coloração esbranquiçada do fluido seminal. Asteriscos indicam as glândulas acessórias. AVD = vaso deferente anterior; MVD = vaso deferente medial; PVD = vaso deferente posterior; T = testículos; VD = vaso deferente.

**Figura 2. Histologia dos testículos, espermatogênese e espermiogênese de *Dilocarcinus pagei*.**

A, Vista geral do testículo do tipo tubular, com regiões preenchidas por espermátócitos primários, uma com espermátócitos secundários e uma preenchida por espermátides iniciais. Asteriscos indicam a zona de evacuação onde localizam-se os espermatozoides; setas pretas indicam células acessórias [HE]. B, Túbulo germinativo preenchido por espermatogônias e seus núcleos com aspecto granular. Notar células acessórias (seta preta) [azul de toluidina pH 4.0]. C, Espermátócitos primários em prófase em túbulo germinativo delimitado por células acessórias (seta preta) [azul de toluidina pH 4.0]. D, Espermátócitos secundários com cromatina com aspecto granular e condensada circundados por células acessórias (seta preta) dos túbulos germinativos [azul de toluidina pH 4.0]. E, Espermátides iniciais apresentando núcleo em forma de anel (cabeça de seta branca) com região  $\beta$ -metacromática e início da formação da vesícula proacrossomal (cabeça de seta preta) em túbulo germinativo delimitado por células acessórias (seta preta) [azul de toluidina pH 4.0]. F, Espermátides intermediárias com núcleo em forma de “D” (cabeça de seta branca) e formação da vesícula proacrossomal com  $\alpha$ -metacromasia (cabeça de seta preta), circundadas por células acessórias (seta preta) e núcleo com região  $\beta$ -metacromática [azul de toluidina pH 4.0]. G, Espermátides intermediárias com vesícula proacrossomal fortemente reativa à técnica para detecção de polissacarídeos neutros (cabeça de seta preta) e núcleo em forma de “D” (cabeça de seta branca) [PAS]. H, Espermátides tardias com núcleo em forma de “C” com região em  $\beta$ -metacromasia (cabeça de seta branca) formando um copo onde se encaixa a vesícula proacrossomal  $\alpha$ -metacromática (cabeça de seta preta) [azul de toluidina pH 4.0]. Notar o aumento de tamanho do núcleo das células acessórias (seta preta) [azul de toluidina pH 4.0]. I, Espermátides tardias com vesícula proacrossomal fortemente reativa à técnica para detecção de polissacarídeos neutros (cabeça de seta preta) e núcleo em forma de “C” (cabeça de seta branca) [PAS]. J, Espermatóforo com parede  $\alpha$ -metacromática (seta preta) contendo espermatozoides com acrossomo em  $\alpha$ -metacromasia (cabeça de seta preta) e núcleo com  $\beta$ -metacromasia (cabeça de seta branca) [azul de toluidina pH 4.0]. K, Espermatozoide com acrossomo fortemente reativo a técnica para detecção de polissacarídeos neutros (cabeça de seta preta) e núcleo formado (cabeça de seta branca) [PAS]. EST = espermátide inicial; LST = espermátide tardia; MST = espermátide intermediária; SPC1 = espermátócito primário; SPC2 = espermátócito secundário; SPG = espermatogônia; SZ = espermatozoide.

**Figura 3. Histologia e histoquímica do vaso deferente de *Dilocarcinus pagei*.**

A, Porção proximal da AVD com epitélio cúbico colunar simples e núcleos basais irregulares, recoberto por uma delgada camada muscular e tecido conjuntivo. Na porção luminal, os espermatozoides estão livres em secreção basófila [HE]. B, Secreção componente do fluido seminal proteica (cabeça de seta preta) na porção proximal da AVD [Xylidine ponceau]. C, Secreção componente do fluido seminal reativa a técnica para detecção de polissacarídeos neutros (cabeça de seta preta) na porção proximal da AVD [PAS]. D, Porção distal da AVD apresentando espermatóforos (seta preta) e epitélio cúbico colunar simples recoberto por uma delgada camada muscular e tecido conjuntivo. Nesta porção a secreção mostra-se fracamente acidófila (seta preta) [HE]. E, Secreção componente do fluido seminal fortemente proteica (cabeça de seta preta) na porção distal da AVD na qual os espermatóforos estão imersos [Xylidine ponceau]. F, Secreção da porção distal da AVD fracamente positiva à técnica de coloração para detecção de polissacarídeos neutros (cabeça de seta preta) [PAS]. G, MVD com epitélio cúbico simples e delgada camada muscular. Notar no detalhe os espermatóforos e secreção granular acidófila (cabeça de seta preta) [HE]. H, Secreção da MVD fortemente corada pela técnica de detecção de proteínas. Detalhe mostra os grânulos de secreção proteicos (cabeça de seta preta) [Xylidine ponceau]. I, Secreção granular da MVD fracamente positiva para técnica de polissacarídeos neutros. Detalhe dos grânulos de secreção fracamente corados para polissacarídeos neutros (cabeça de seta preta) [PAS]. J, MVD submetida à técnica de coloração azul de Alcian (pH 2,5) para detecção de polissacarídeos ácidos. Notar somente os núcleos dos espermatozoides corados (cabeça de seta branca). K, Glândulas acessórias da PVD com secreção acidófila no lúmen (asteriscos) [HE]. L, Glândulas acessórias com secreção proteica no lúmen. Detalhe dos grânulos de secreção (asterisco) [Xylidine ponceau]. M, Secreção das glândulas acessórias coradas para polissacarídeos neutros. Detalhe dos grânulos de secreção (asterisco) [PAS]. AVD = vaso deferente anterior; AG = glândula acessória; CT = tecido conjuntivo; EP = epitélio; M = músculo; MVD = vaso deferente medial; PVD = vaso deferente posterior; Sph = espermatóforo; SZ = espermatozoide.

Figura 4. Histologia dos testículos, espermatogênese e espermiogênese de *Sylviocarcinus pictus*.

A, vista geral do testículo do tipo tubular, com túbulos germinativos delimitados por células acessórias (setas pretas) e preenchidos por células germinativas em um mesmo estágio de espermatogênese. Notar a zona de evacuação (asteriscos) onde localizam-se os espermatozoides [HE]. B, Túbulo germinativo delimitado por células acessórias (seta preta) preenchido por espermatogônias em prófase [azul de toluidina pH 4.0]. C, Espermatócitos primários em túbulo delimitado por células acessórias (seta preta) [azul de toluidina pH 4.0]. D, Espermatócitos secundários e seus respectivos núcleos com aspecto granular e células acessórias (seta preta) delimitando o túbulo germinativo [azul de toluidina pH 4.0]. E, Espermátides iniciais com cromatina formando um anel (cabeça de seta branca) e centro menos reativo à coloração e início da formação da vesícula proacrossomal (cabeça de seta preta) em túbulo delimitado por células acessórias (seta preta) [azul de toluidina pH 4.0]. F, Espermátides intermediárias com núcleo em forma de “D” e formação da vesícula proacrossomal (cabeça de seta preta), circundadas por células acessórias (seta preta) [azul de toluidina pH 4.0]. G, Espermátides intermediárias com vesícula proacrossomal fortemente reativa à técnica para detecção de polissacarídeos neutros (cabeça de seta preta) e núcleo em forma de “D” (cabeça de seta branca) [PAS]. H, Espermátides tardias com núcleo em forma de “C” apresentando  $\beta$ -metacromasia, formando uma “taça” onde localiza-se a vesícula proacrossomal  $\alpha$ -metacromática [azul de toluidina pH 4.0]. I, Espermátides tardias com vesícula proacrossomal fortemente reativa à técnica para detecção de polissacarídeos neutros (cabeça de seta preta) e núcleo em forma de “C” (cabeça de seta branca) [PAS]. J, zona de evacuação contendo espermatozoides com acrossomo em  $\alpha$ -metacromasia e núcleo com região com  $\beta$ -metacromasia [azul de toluidina pH 4.0]. K, Espermatozoide com acrossomo formado (cabeça de seta preta) e núcleo formado (cabeça de seta branca) [PAS]. CT = tecido conjuntivo; EST = espermátide inicial; LST = espermátide tardia; MST = espermátide intermediária; SPC1 = espermatócito primário; SPC2 = espermatócito secundário; SPG = espermatogônia; SZ = espermatozoide.

**Figura 5. Histologia e histoquímica do vaso deferente de *Sylviocarcinus pictus*.**

A, Porção proximal da AVD com epitélio cúbico simples, recoberto por uma delgada camada muscular. Nesta região os espermatozoides encontram-se livres, imersos em secreção basófila [HE]. B, Secreção componente do fluido seminal proteica (cabeça de seta preta) na porção proximal da AVD [Xylidine ponceau]. C, Secreção componente do fluido seminal fracamente positiva para polissacarídeos neutros (cabeça de seta preta) na porção proximal da AVD [PAS]. D, Porção distal da AVD apresentando epitélio cúbico colunar simples com núcleos irregulares, recoberto por uma delgada camada muscular e tecido conjuntivo. Notar no detalhe os espermatóforos em secreção fracamente basófila (cabeça de seta preta) [HE]. E, Secreção componente do fluido seminal fortemente proteica (cabeça de seta preta) na porção distal da AVD, na qual os espermatóforos estão imersos [Xylidine ponceau]. F, Secreção componente do fluido seminal com reação fortemente positiva para técnica de coloração para polissacarídeos neutros (cabeça de seta preta) na porção distal da AVD [PAS]. G, MVD epitélio cúbico simples recoberto por delgada camada muscular e tecido conjuntivo, preenchida por espermatóforos e secreção acidófila (cabeça de seta preta) [HE]. H, Secreção da MVD com reação positiva para técnica de detecção de proteínas (cabeça de seta preta) [Xylidine ponceau]. I, Secreção da MVD fortemente positiva para técnica de polissacarídeos neutros. Notar no detalhe a secreção formadora dos espermatóforos positiva para polissacarídeos neutros [PAS]. J, PVD com epitélio cúbico simples e núcleos irregulares. Detalhe dos poucos espermatóforos no lúmen da PVD [HE]. K, Grânulos de secreção diminutos no lúmen da PVD fracamente positivo para proteínas (asterisco) [Xylidine ponceau]. L, Secreção no lúmen da PVD fracamente positiva para polissacarídeos neutros. Notar os diminutos grânulos de secreção (asterisco) [PAS]. AVD = vaso deferente anterior; CT = tecido conjuntivo; EP = epitélio; M = músculo; MVD = vaso deferente medial; PVD = vaso deferente posterior; Sph = espermatóforo; SZ = espermatozoide.

Figura 6. Experimento de transferência espermática em *Dilocarcinus pagei*.

A, Casal de *D. pagei* pareado durante a cópula. B, Receptáculo seminal de uma fêmea que realizou somente uma cópula. Notar massa espermática homogênea recebida do macho. C, Receptáculo seminal de uma fêmea que realizou duas cópulas. Notar as duas massas de fluido seminal masculino formando dois pacotes espermáticos. Asterisco indica parte do receptáculo seminal vazio. D, Receptáculo seminal de uma fêmea que realizou três cópulas. Notar as três massas de secreção seminal proveniente dos machos formando três pacotes espermáticos. F = fêmea; M = macho; Ov = ovário; V = vulva; Vg = vagina.

Figura 1

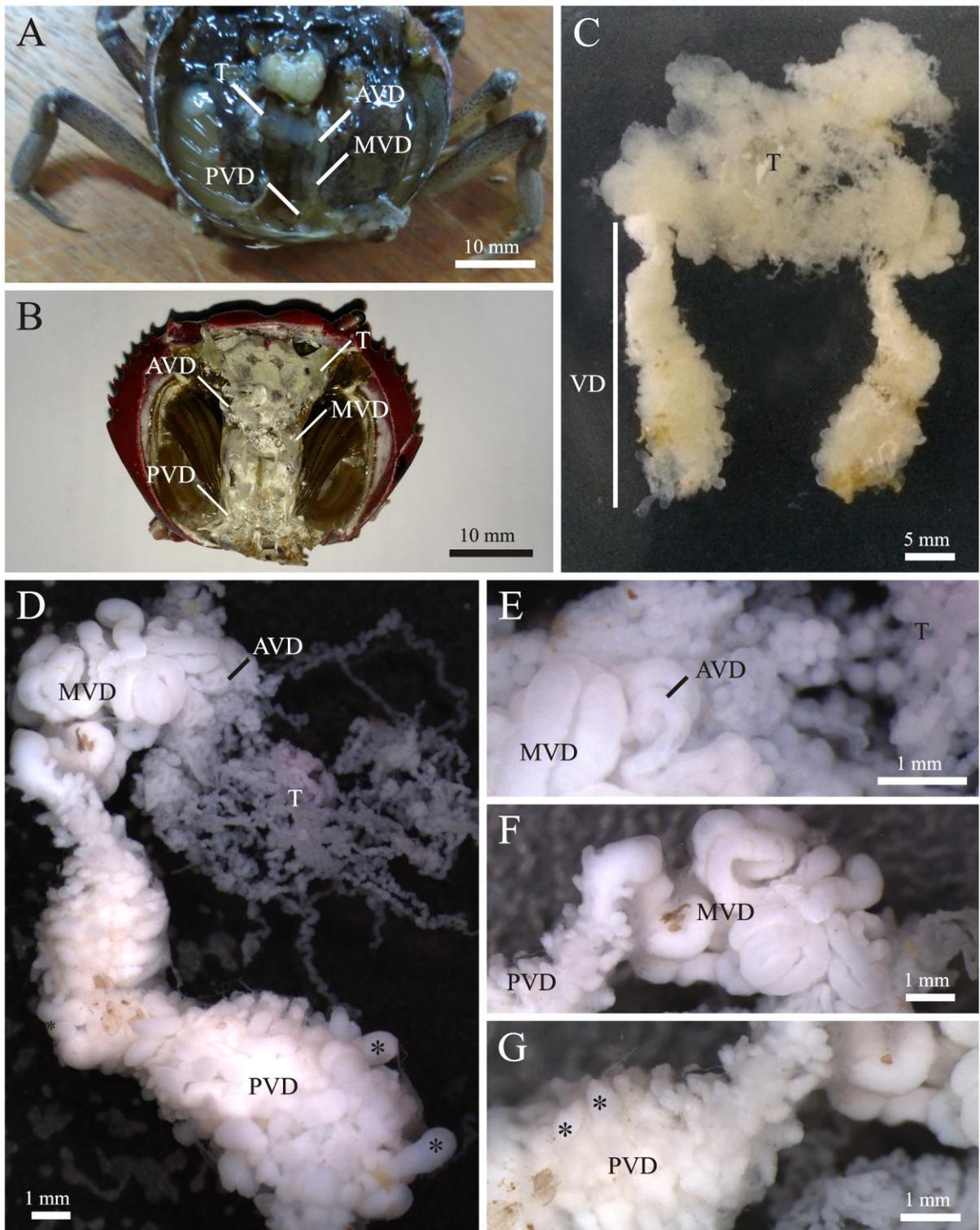


Figura 2

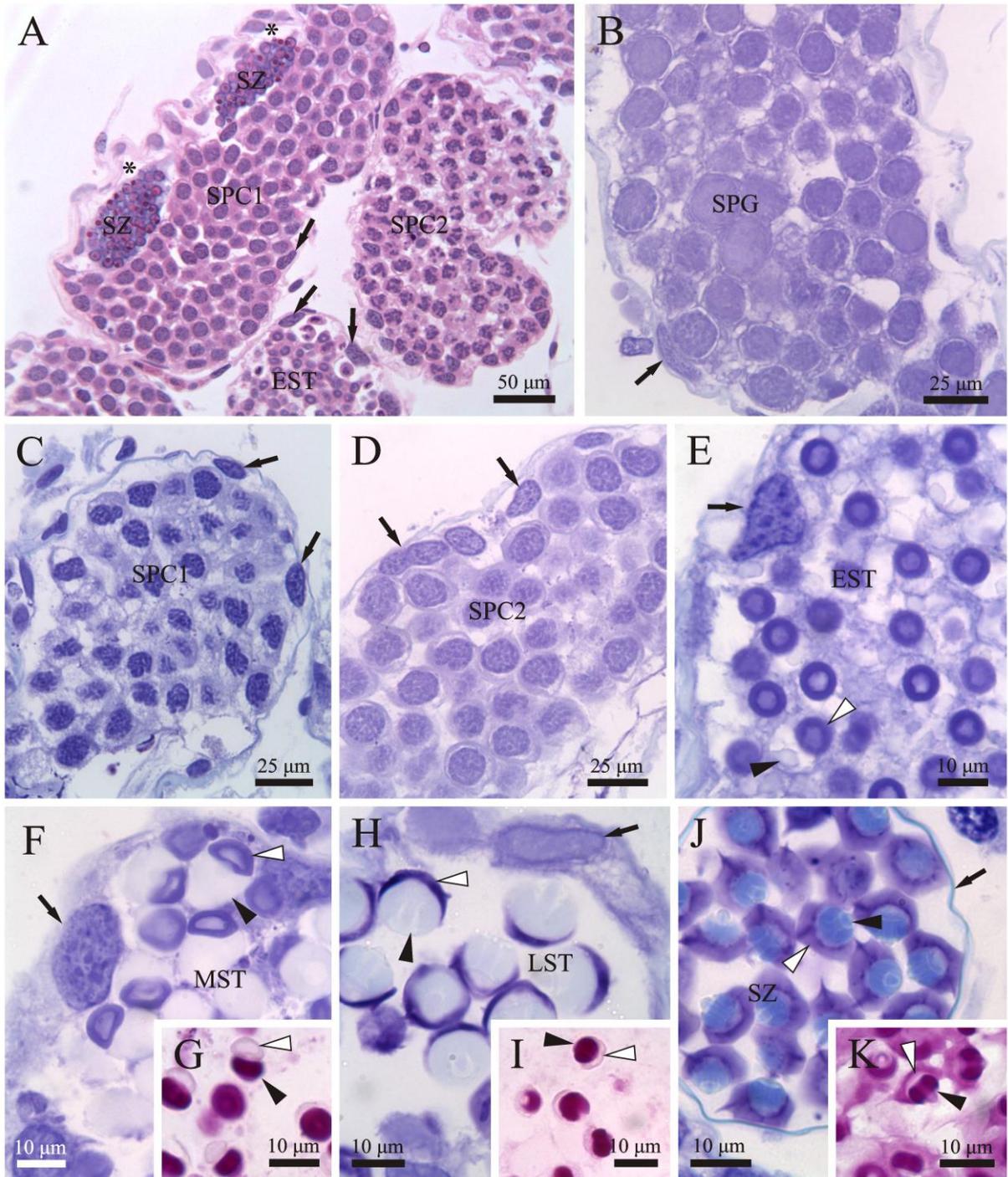


Figura 3

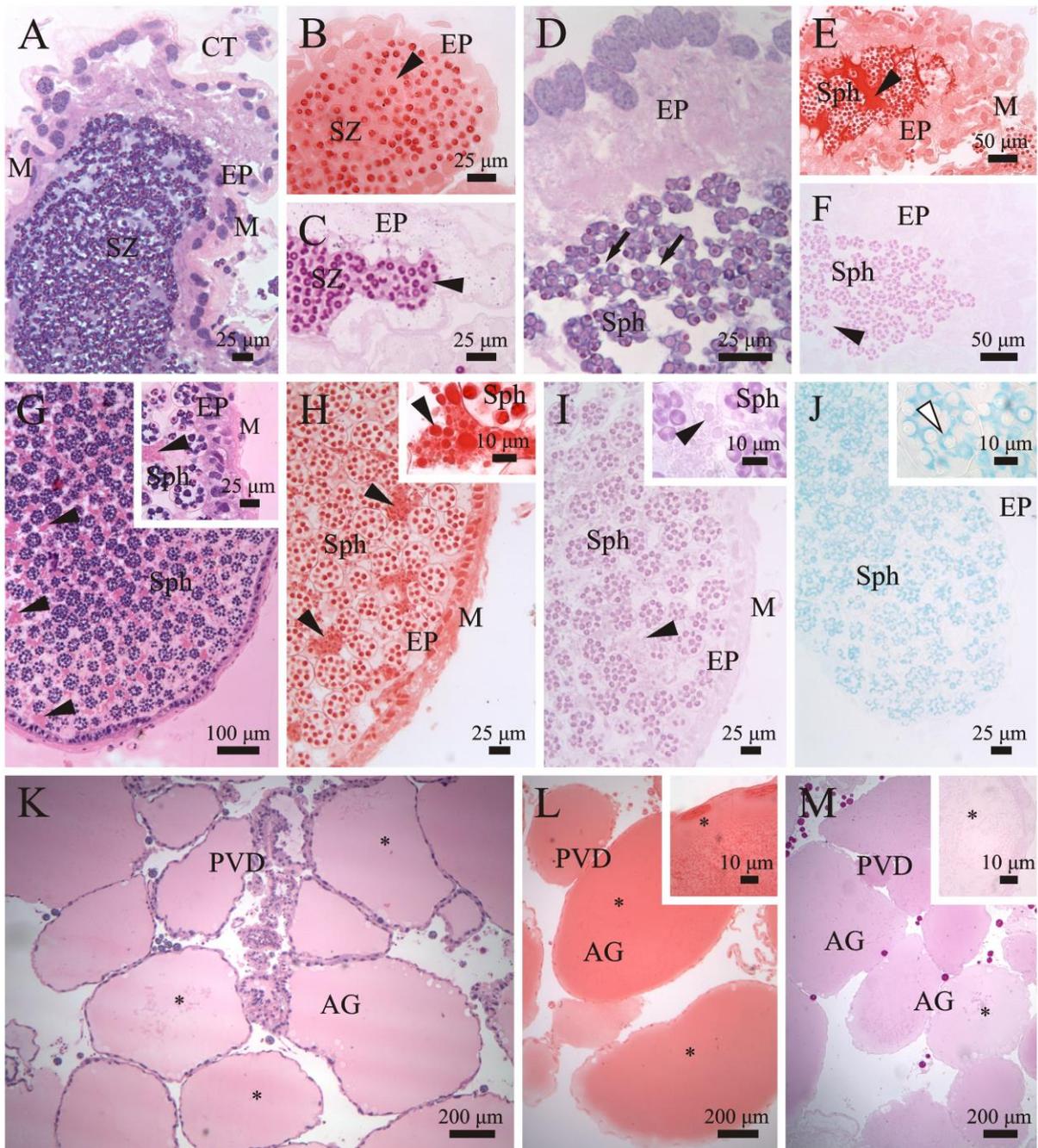


Figura 4

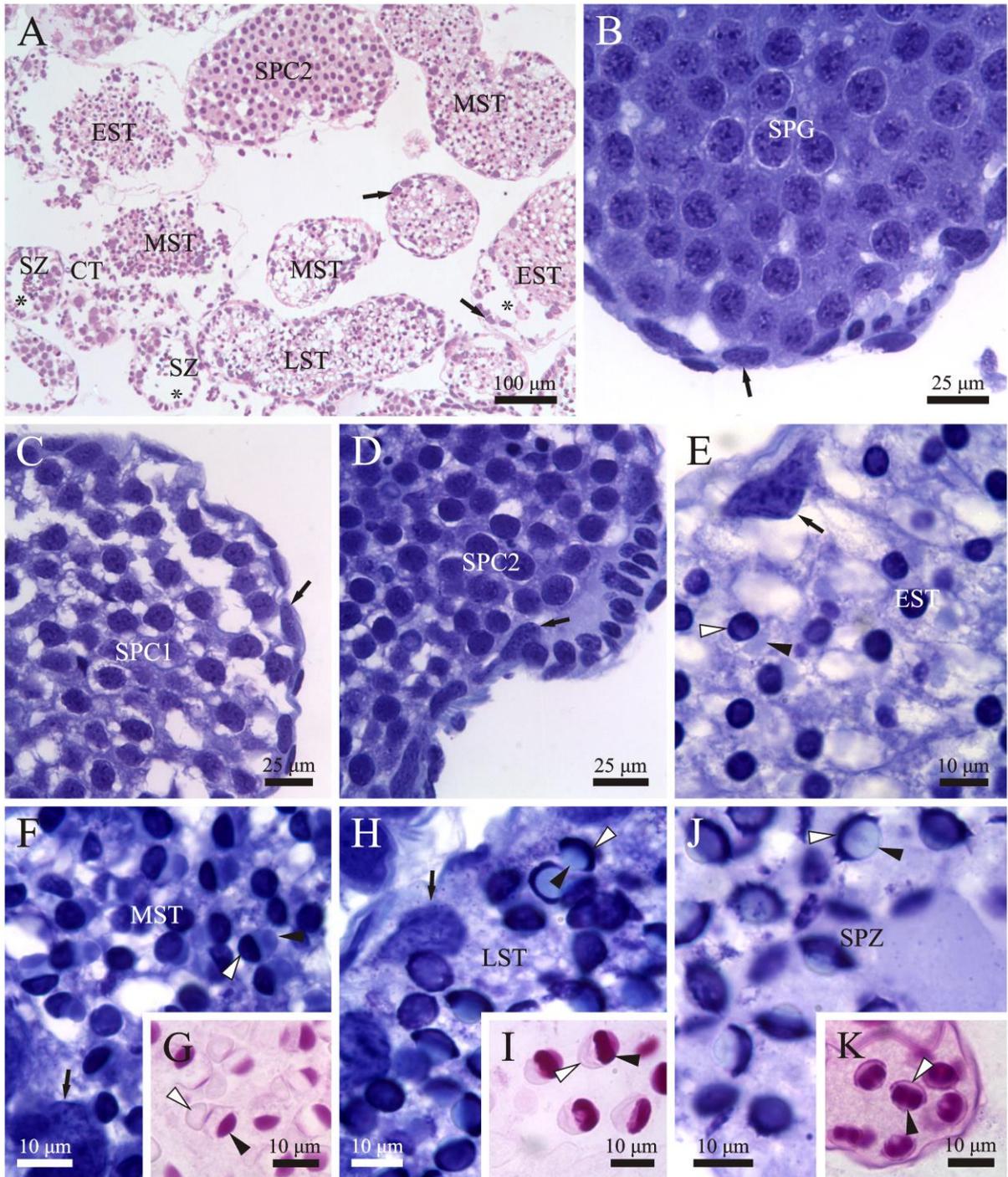


Figura 5

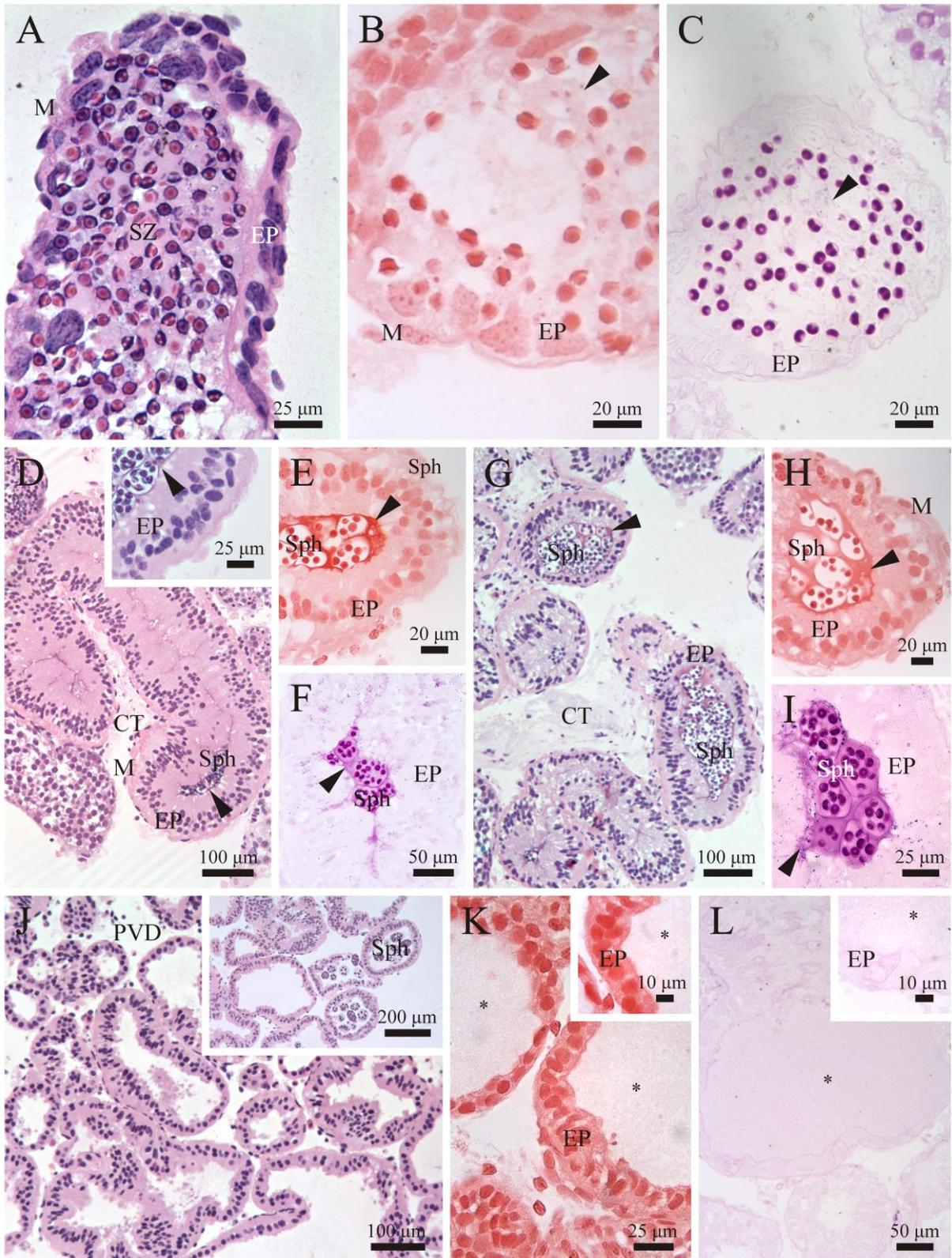
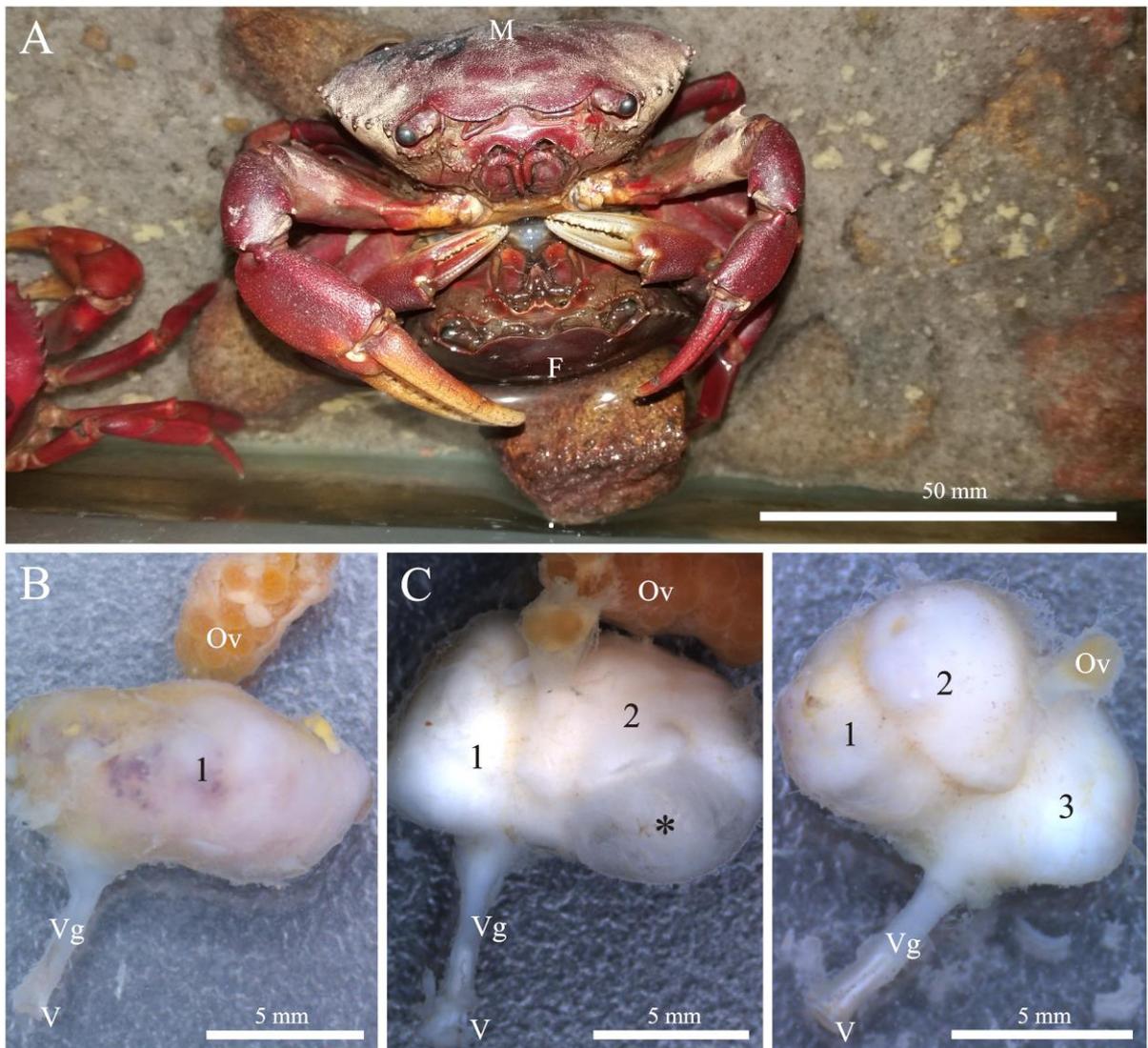


Figura 6



# Capítulo II

**Ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides de**  
*Dilocarcinus pagei*, *Zilchiopsis oronensis* e *Valdivia serrata*  
**(Crustacea: Decapoda: Trichodactylidae)**

Leo Jaime Filgueira de Oliveira, Fernando José Zara

Capítulo redigido de acordo com as normas do periódico *Journal of Natural History*

**Ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides de *Dilocarcinus pagei*, *Zilchiopsis oronensis* e *Valdivia serrata* (Crustacea: Decapoda: Trichodactylidae)**

Leo Jaime Filgueira de Oliveira, Fernando José Zara

Centro de Aquicultura (CAUNESP) e Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML) -  
Departamento de Biologia Aplicada (DBAA) - Via de Acesso Prof. Donato Castellane, S/N,  
Jaboticabal, SP, CEP: 14884-900, Brasil.

Email:

LJFO leojfo@gmail.com – autor correspondente

FJZ fjzara@gmail.com

**Agradecimentos**

Os autores agradecem ao CNPq pela bolsa de pós-graduação (#134523/2015-6) concedido a LJFO, CAPES Ciências do Mar (CIMAR) II (Proc. #1989/2014) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Proc. #2010/50188-8 e 2016/25344-2) concedidos a FJZ. Ao ICMBio pela licença para coleta #52258-1. Ao Dr. Célio Magalhães (INPA) pela confirmação da identificação das espécies. À Márcia F. Mataqueiro pelo suporte técnico e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da FCAV – Unesp / Jaboticabal. Ao Laboratório de Zoologia e ao Grupo de Pesquisa em Biologia e Produção de Organismos Aquáticos Amazônicos do ICET/UFAM, coordenados por Gustavo Yomar Hattori e Bruno Sampaio Sant'Anna.

## Resumo

A ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides de caranguejos de água doce Trichodactylidae são pouco conhecidas, sem a descrição de caracteres exclusivos para a família. Neste estudo, descrevemos e comparamos a ultraestrutura dos espermatóforos e espermatozoides de *Dilocarcinus pagei*, *Zilchiopsis oronensis* e *Valdivia serrata*. Além disso, realizamos uma análise comparativa com outras espécies de caranguejos de água doce descritos na literatura. Fragmentos do vaso deferente foram processados de acordo com a rotina para microscopia eletrônica de transmissão. As três espécies estudadas apresentaram espermatóforos coenospérmicos, e *Z. oronensis* e *V. serrata* apresentaram também espermatóforos cleistospérmicos, sendo pela primeira vez descritos em Trichodactylidae. Os espermatozoides das três espécies investigadas apresentaram o padrão encontrado em Brachyura, entretanto foram encontradas características comuns para a família Trichodactylidae. O opérculo é saliente, não perfurado, espesso, com a presença de anel opercular acessório, sendo arredondado em *D. pagei* e triangular em *Z. oronensis* e *V. serrata*. A câmara perforatorial é panduriforme em *D. pagei* e triangular em *Z. oronensis* e *V. serrata*. A membrana da câmara perforatorial em *D. pagei* e *Z. oronensis*, e oblonga em *V. serrata*. A membrana da câmara perforatorial em *D. pagei* apresenta numerosas corrugações curtas, enquanto *Z. oronensis* e *V. serrata* apresentam poucas corrugações, porém profundas. As três espécies apresentam uma placa núcleo-citoplasmática espessa, sendo lamelar em *D. pagei* e uniforme em *Z. oronensis* e *V. serrata*. Esta última característica provavelmente é uma autapomorfia para Trichodactylidae que diverge de todas as outras famílias de caranguejos dulcícolas, apoiando a hipótese de pelo menos duas origens independentes das linhagens de caranguejos de água doce.

**Palavras-chave:** Brachyura; caranguejo de água doce; microscopia eletrônica de transmissão, sistema reprodutor masculino.

**Abstract**

The ultrastructure of spermatophores and spermatozoa of freshwater crabs Trichodactylidae remain unknown, without the description of uniquely characters to the family. In this study, we described and compared the ultrastructure of spermatophores and spermatozoa of *Dilocarcinus pagei*, *Zilchiopsis oronensis* and *Valdivia serrata*. In addition, we performed a comparative analysis with other freshwater crabs described in the literature. Fragments of the vas deferens were processed according to the routine for transmission electron microscopy. All the studied species presented coenospermic spermatophores, and *Z. oronensis* and *V. serrata* also presented cleistospermic spermatophores, described here for the first time in Trichodactylidae. The spermatozoa of the three species investigated presented the pattern found in Brachyura, however common traits were found for the family Trichodactylidae. The operculum is protruding, not perforated, thick, with the presence of an opercular accessory ring, being rounded in *D. pagei* and triangular in *Z. oronensis* and *V. serrata*. The perforatorial chamber is panduriform in *D. pagei* and *Z. oronensis*, and oblong in *V. serrata*. The membrane of the perforatorial chamber presents numerous short corrugations in *D. pagei*, while *Z. oronensis* and *V. serrata* present few but deep corrugations. The three species present a thick nucleus-cytoplasmic plate, being lamellar in *D. pagei* and uniform in *Z. oronensis* and *V. serrata*. The latter feature is probably an autapomorphy for Trichodactylidae that diverges from all other sweet crab families, supporting the hypothesis of at least two independent sources of freshwater crab lineages.

**Keywords:** Brachyura; freshwater crab; male reproductive system; transmission electron microscopy.

## **Introdução**

Os espermatozoides em Brachyura são células imóveis e aflageladas, com vesícula acrossomal com zonas ou camadas esféricas concêntricas, revestido por uma membrana moderadamente elétron-densa. Centralmente, o espermatozoide é penetrado pela câmara perforatorial ou tubo perfurador. Sobre o ápice da câmara perforatorial observa-se o opérculo elétron-denso, o qual pode ser perfurado ou contínuo, sendo algumas vezes adornado. O núcleo apresenta cromatina condensada e braços radiais que podem formar projeções, além de conter elementos de citoesqueleto, como microtúbulos (Jamieson 1994; Jamieson & Tudge 2000; Tudge 2009; Tudge et al. 2014). Algumas características têm sido descritas como sinapomorfias em Eubrachyura, como a presença de anel espessado e presença de três braços radiais, características encontradas na maioria dos Majoidea (Tudge et al. 2014). Recentemente, diversos estudos vêm correlacionando os dados da ultraestrutura dos espermatozoides com a filogenia molecular, buscando encontrar padrões mais robustos para estudos filogenéticos e evolução dos caracteres espermáticos (Klaus & Brandis 2011; Tudge et al. 2014; Assugeni et al. 2017).

Para Trichodactylidae, somente a ultraestrutura do espermatozoide de *Dilocarcinus septemdentatus* Herbst, 1783 foi descrita (Matos et al. 1996). Porém, tal descrição é bastante simplificada, sem profundas comparações com outros grupos já descritos na literatura. Recentemente, outras famílias de caranguejo de água doce do sudeste asiático, como Potamonautidae Bott, 1970, Potamidae Ortmann, 1896 e Gecarcinucidae Rathbun, 1904, além de duas espécies europeias desta última família foram descritas e comparadas, somando atualmente um total de 28 spp. de caranguejos de água doce com a ultraestrutura dos espermatozoides conhecida (Guinot et al. 1997; Klaus et al. 2009; Klaus & Brandis 2011; Klaus et al. 2011).

O empacotamento dos espermatozoides em espermatóforos é conhecido em diversos grupos de decápodes, como Penaeoidea (Bauer & Cash 1991), Astacidea (Erkan et al. 2009), Anomura (Tudge 1991) e Brachyura (Guinot et al. 1997; Klaus et al. 2009; Tiseo et al. 2017). Os espermatóforos podem ocorrer de duas formas, sendo a cleistospermia (um espermatozoide por espermatóforo) e coenospermia (vários espermatozoides por espermatóforo). Em braquiuros, os espermatóforos podem ser formados por matriz homogênea (Klaus et al. 2009), ou apresentar de uma a sete camadas com diferentes composições e eletrodensidades (Tiseo et al. 2014, 2017). Estes últimos autores afirmam que os espermatóforos não apresentam características com valor taxonômico, e ainda que estes estão mais relacionados com a deiscência, que para impedir polispermia, como sugerido por Guinot et al. (1997).

O conhecimento dos espermatóforos e espermatozoides dos caranguejos de água doce da família Trichodactylidae H. Milne Edwards, 1853 pode auxiliar no esclarecimento das relações filogenéticas e preencher lacunas quanto as dúvidas sobre a origem e relação de parentesco deste grupo (Ng et al. 2008; Tsang et al. 2014). Utilizando a ultraestrutura do espermatozoide de diferentes gêneros de Trichodactylidae pode-se obter caracteres específicos para a família e assim fornecer caracteres adicionais aos dados moleculares sobre os caranguejos de água doce (Tsang et al. 2014). Assim, estes dados podem ser úteis para identificar as relações filogenéticas entre estes caranguejos de água doce, como foi demonstrado para camarões Penaeoidea (Camargo et al. 2015; 2017).

A ultraestrutura dos espermatozoides e espermatóforos ainda permanece inexplorada em Trichodactylidae (Klaus et al. 2009). Desta maneira não é possível a comparação com outras famílias filogeneticamente próximas ou outras famílias de caranguejos de água doce. Além de aspectos ecológicos e taxonômicos, o conhecimento dos aspectos reprodutivos de tricodactilídeos é importante a conservação da biodiversidade, não só carcinológica, como também dos ecossistemas nos quais estes animais estão inseridos. Com isso, o objetivo do

presente estudo foi descrever de maneira comparada o espermatóforo e espermatozoide de *Dilocarcinus pagei* Stimpson, 1861, *Zilchiopsis oronensis* (Pretzmann, 1968) e *Valdivia serrata* White, 1847, buscando caracteres que sejam exclusivos da família Trichodactylidae. Além disso, comparar o espermatozoide e os espermatóforos com outra espécie de Trichodactylidae e de outras famílias de água doce já descritas, buscando verificar se as características compartilhadas corroboram a filogenia molecular.

### **Material e Métodos**

Os caranguejos foram coletados manualmente ou com auxílio de puçás de mão (30 x 70 mm) durante 2h nas margens do Médio Rio Amazonas, Itacoatiara (AM) (03°07'11,10"S, 58°27'13,0"O). Os animais foram encaminhados ao Laboratório de Zoologia do Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Amazonas (ICET/UFAM), onde foram aclimatados até o momento dos procedimentos para rotina de microscopia eletrônica de transmissão. Os espécimes foram anestesiados por choque térmico (-20 °C / 5 min), posteriormente tiveram a porção dorsal da carapaça removida para que fosse localizado o sistema reprodutor. Após a remoção, fragmentos do vaso deferente anterior e médio foram fixados em glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) por 24 h.

O material dissecado e fixado foi encaminhado para o Laboratório de Morfologia de Invertebrados (IML - FCAV/UNESP Jaboticabal), onde foram então submetidas a três lavagens (10 min) no mesmo, pós-fixados em tetróxido de ósmio a 1% tamponado (1h) e novamente submetidos a 3 lavagens. A contração "En Bloc" foi realizada com acetato de uranila 1% aquoso *overnight*. As amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona (50 – 100%), sendo posteriormente embebidas e incluídas em resina Epon-Araudite. Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo Leica UC7, coletados em grades de cobre e contrastados com acetato de uranila 2% em água por 45 min., seguido de citrato de chumbo

0,4% em NaOH 0,1M por 10 min. (Reynolds 1963). As grades foram analisadas e fotografadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1010 operado com 80KV.

Para a descrição dos espermatozoides foi utilizada a nomenclatura proposta por Jamieson (1994), Guinot et al. (1997), Klaus et al. (2009), Tudge et al. (2014) e Tiseo et al. (2017). A morfologia da câmara perforatorial foi descrita com base nas medidas e nomenclatura das formas proposta para gregarinas (Clopton 2004). Para isto, a descrição geral da forma foi tomada por uma linha transversal no limite do anel espessado, sendo a mesma metodologia aplicada ao ápice da câmara perforatorial, porém a linha transversal foi realizada na altura do contato da câmara com a camada subopercular.

## **Resultados**

Os espermatozoides das três espécies aqui investigadas apresentam opérculo fechado, com ápice triangular pontiagudo e elétron-denso. A câmara perforatorial apresenta elementos de túbulos perforatórios associados à membrana, formando corrugações. A base da câmara perforatorial é circundada pelo anel espessado bem desenvolvido. O acrossomo possui três camadas concêntricas com diferentes eletrodensidades e ausência de lamelas. O acrossomo é circundado pelo núcleo em forma de “C”, com braços laterais preenchidos por cromatina fibrilar (Figura 1-3). Os caracteres morfológicos dos espermatóforos e espermatozoides de *D. pagei*, *Z. oronensis*, *V. serrata*, bem como *D. septemdentatus* descrito por Matos et al. (1996), estão sumarizados na Tabela 1.

### ***Dilocarcinus pagei***

Nesta espécie foram encontrados somente espermatóforos coenospérmicos com morfologia de irregular a elipsoide (Figura 1A). A secreção no interior dos espermatóforos é menos elétron-

densa que a exterior, e a parede composta por secreção elétron-densa que delimita os espermatóforos é delgada (Figura 1A e B).

Os espermatozoides de apresentam morfologia globular, com acrossomo esferoidal, centralmente penetrado pela câmara perforatorial, circundado pelo núcleo (Figura 1C). A câmara perforatorial é classificada como panduriforme, com ápice oblongo (Figura 1C e D). O acrossomo possui três camadas: uma interna estreitamente deltoide elétron-densa contínua com o anel espessado, a externa larga menos elétron-densa que a interna e a periférica delgada e com menor eletrodensidade entre todas (Figura 1C-E). O opérculo não é perfurado, saliente arredondado, delgado e se estende sobre o acrossomo, expandindo-se lateralmente (Figura 1D e E). O ápice do opérculo, marcado pela extremidade da câmara perforatorial adjacente, também é arredondado. Logo abaixo do opérculo encontra-se a região subopercular (Figura 1D e E), delgada e menos elétron-densa que o opérculo, estendendo-se sobre o ápice da câmara perforatorial ao longo das projeções laterais do opérculo. Sob a extremidade lateral do opérculo está o anel opercular acessório, menos elétron-densa e mais espesso opérculo (Figura 1E). A base do perforatório apresenta um alargamento, preenchido por elementos dos túbulos perforatórios e está circundada pelo anel espessado, de onde parte a camada interna do acrossomo (Figura 1F). Nesta região encontram-se ainda mitocôndrias degeneradas em uma camada citoplasmática vestigial (Figura 1C e F). O núcleo está preenchido por cromatina de aspecto fibrilar, e é envolto por uma unidade de membrana que o separa do meio externo. Na face em contato com o citoplasma, na base da câmara perforatorial, o envoltório nuclear é marcadamente elétron-denso formando a placa núcleo-citoplasmática (Figura 1F e G). Em cortes transversais, a câmara perforatorial, envolta por uma unidade de membrana, apresenta numerosas corrugações pouco acentuadas nas quais associam-se os elementos dos túbulos perforatoriais (Figura 1G e H).

***Zilchiopsis oronensis***

A morfologia dos espermátóforos varia de esférica a elíptica, com secreção interna menos elétron-densa que a externa, sendo a parede elétron-densa e espessa (Figura 2A). Esta espécie produz tanto espermátóforos coenospérmicos, quanto cleistospérmicos sem diferenças ultraestruturais (Figura 2A e B). Nos espermátóforos cleistospérmicos o espermatozoide fica comprimido, restando pouco espaço entre o espermatozoide e a parede espermatofórica (Figura 2B).

Os espermatozoides apresentam morfologia globular, com acrossomo esferoidal circundado em sua maior extensão pelo núcleo (Figura 2C). A câmara perforatorial é panduriforme com o ápice profundamente romboide e com marcadas depressões laterais (Figura 2C e D). O opérculo é saliente, não perfurado, elétron-denso, delgado, com ápice triangular pontiagudo (Figura 2C-E). No opérculo nota-se a presença de saliências as quais formam as depressões laterais no ápice da câmara perforatorial. O opérculo expande-se lateralmente se estendendo sobre o acrossomo (Figura 2C e E). Abaixo do opérculo encontra-se a região subopercular, menos elétron-densa moderada elétron-densidade que se estende até a região das projeções laterais do opérculo (Figura 2E). Sob a extremidade da projeção lateral do opérculo encontra-se o anel opercular acessório que apresenta menor elétron-densidade e maior espessura em relação ao opérculo (Figura 2E). O acrossomo é formado por três camadas adjacentes, sendo a interna ampuliforme elétron-densa, a externa larga e a periférica delgada com menor eletrodensidade entre as três (Figura 2C e E). O perforatório é panduriforme, apresentando um estreitamento em sua base, onde encontram-se elementos dos túbulos perforatórios e é circundada pelo anel espessado (Figura 2F). Ainda nesta região encontram-se mitocôndrias degeneradas no citoplasma (Figura 2C e G). A base lateral do acrossomo apresenta uma leve concavidade, acompanhada pela morfologia no anel espessado e pelo material citoplasmático com diferente eletrodensidade, o qual preenche a câmara perforatorial

(Figura 2C e F). O núcleo apresenta cromatina fibrilar, envolto por uma unidade de membrana e a placa núcleo-citoplasmática elétron-densa também está presente, na mesma posição, marcadamente sob o material citoplasmático que é contínuo com câmara perforatorial (Figura 2F). Em corte transversal, observam-se as três camadas concêntricas, o acrossomo (Figura 2G). A câmara perforatorial é envolta por uma unidade de membrana que apresenta corrugações pouco numerosas, porém profundas, que estão em contato com os elementos dos túbulos perforatoriais (Figura 2H).

### *Valdivia serrata*

Esta espécie apresenta espermátóforos coenospérmicos e cleistospérmicos com secreção interior menos elétron-densa que a exterior (Figura 3A). Os dois tipos de espermátóforos não apresentam diferenças ultraestruturais (Figura 3A-C). A parede dos espermátóforos é composta por duas camadas sendo a externa delgada e menos elétron-densa que a interna, que é espessa e de maior eletrodensidade que a interior (Figura 3B). Os espermátóforos em cleistospermia exibem pouco espaço entre sua parede e os espermatozoides (Figura 3C).

A morfologia dos espermatozoides é globular, e o acrossomo é esférico circundado pelo núcleo (Figura 3D). A câmara perforatorial tem lados paralelos, com formato estreitamente oblongo. O ápice da câmara perforatorial é piriforme, apresentando depressões laterais devido a saliência do opérculo (Figura 3D e E). O acrossomo apresenta três camadas, a interna luniforme mais elétron-densa, a camada externa larga menos elétron-densa e uma periférica delgada com menor eletrodensidade em relação às duas anteriores (Figura 3D-F). O opérculo é fechado, elétron-denso e espesso, com chanfradura e estende-se sobre as camadas interna e externa do acrossomo (Figura 3E e F). A região subopercular é menos elétron-densa que o opérculo e apresenta formato triangular (Figura 3E). O anel opercular acessório está presente e situa-se abaixo e próxima à extremidade externa do opérculo e superior lateral opercular da

camada interna do acrossomo (Figura 3F). A região lateral da base do acrossomo apresenta uma concavidade acentuada, sobre a qual localiza-se o anel espessado que se estende até a base da câmara perforatorial (Figura 3G). No citoplasma encontram-se mitocôndrias degeneradas, mas o material contínuo com o perforatório mostra diferente eletrodensidade do restante do citoplasma (Figura 3D e G). A cromatina é fibrilar densa e o envoltório tem uma única unidade de membrana e a placa núcleo-citoplasmática elétron-densa (Figura 3G e H). Transversalmente, a câmara perforatorial é envolta por uma unidade de membrana que apresenta reentrâncias profundas, corrugações da câmara perforatorial, as quais parecem estar conectadas aos elementos dos túbulos perforatoriais (Figura 3H).

## **Discussão**

Todas as três espécies avaliadas neste estudo apresentaram espermátóforos coenospérmicos, sendo este o padrão mais comum entre os Brachyura (Castilho et al. 2008; Klaus et al. 2009; Stewart et al. 2010; Zara et al. 2012; Assugeni et al. 2017; Tiseo et al. 2017). Além de espermátóforos coenospérmicos, *Z. oronensis* e *V. serrata* apresentam espermátóforos cleistospérmicos. Tal característica é mais comum em caranguejos dulcícolas, como demonstrado para os Potamidae (Guinot et al. 1997; Klaus et al. 2009) e Gecarcinucidae (Klaus et al. 2009; Klaus et al. 2011).

A ultraestrutura dos espermátóforos encontrados em *D. pagei* são similares àquelas em outros caranguejos dulcícolas, como o Potamidae *Larnaudia beusekomae* (Bott, 1970) e o Gecarcinucidae *Terrathelphusa kuhli* (De Man, 1883) descritas por Klaus et al. (2009), que apresentam uma camada simples de matriz extracelular compondo a parede dos espermátóforos. Os espermátóforos cleistospérmicos de *Z. oronensis* e *V. serrata* deixam pouco espaço entre o espermatozoide e a parede espermatófórica. Não excluindo o fato da parede espermatófórica simples também agir na nutrição do espermatozoide, o pouco espaço entre o

espermatozoide e parede espermatofórica pode estar relacionada a hipótese de a cleistospermia ser uma estratégia para fertilização de ovos lecitotróficos desenvolvida por caranguejos de água doce (Guinot et al. 1997; Klaus et al. 2009). Contudo, tal função não pode ser atribuída ao Grapsoidea, pois esta correlação não foi observada (Tiseo et al. 2014). A presença dos dois tipos de espermatóforos com mesmas características ultraestruturais pode indicar um mecanismo deiscência similar, ou ainda, pode ser um indicativo de transição de coenospermia para cleistospermia.

Nos Trichodactylidae investigados, a ultraestrutura da parede dos espermatóforos apresenta estrutura similar ao reportado em Potamidae (Guinot et al. 1997; Klaus et al. 2009) e Gecarcinucidae (Klaus et al. 2009). Os espermatóforos apresentaram uma camada elétron-densa delgada em *D. pagei* e relativamente mais espessa em *Z. oronensis*, lembrando os espermatóforos compostos por matriz mucosa descritos em Gecarcinucidae (Klaus et al. 2009). Somente os espermatóforos de *V. serrata* apresentaram duas camadas, uma mais elétron-densa e mais espessa que em *D. pagei* e *Z. oronensis*, recoberta por outra elétron-lúcida extremamente delgada. Este padrão de espermatóforos formados por diversas camadas também foi encontrado em Potamidae (Guinot et al. 1997; Klaus et al. 2009). Tais diferenças de eletrodensidade entre as camadas formadoras dos espermatóforos estão relacionadas a sua variada composição bioquímica (Jeyalectumie & Subramoniam 1987). De acordo com estes mesmos autores, as paredes dos espermatóforos são compostas majoritariamente por proteínas, carboidratos e lipídeos, os quais estão relacionados com a nutrição e proteção dos espermatozoides. Entretanto, são necessários estudos sobre a composição bioquímica que evidenciem tal hipótese sobre os espermatóforos.

Em *V. serrata*, as camadas das paredes espermatofóricas lembram aqueles descritos em *Potamon ibericum* (Bieberstein, 1808) por Guinot et al. (1997). Entretanto, os espermatóforos de *P. ibericum* apresentam uma camada externa elétron-lúcida relativamente

mais espessa que os de *V. serrata*. Paredes espermatofóricas similares as de *V. serrata* foram também encontradas nos Potamidae *Johora singaporensis* Ng, 1986, *Thaiphusa sirikit* (Naiyanetr, 1992) e nos Gecarcinucidae *Heterothelphusa fatum* Ng, 1997, *Sartoriana spinigera* (Wood-Mason, 1871) e *Sayamia bangkokensis* (Naiyanetr, 1982) investigados por Klaus et al. (2009). Estas diferentes camadas provavelmente apresentam características bioquímicas distintas, cuja função esteja ligada à deiscência no interior do receptáculo seminal das fêmeas.

A presença dos dois tipos de espermátóforos em Trichodactylidae indicam que esta característica, não quanto a forma, mas quanto ao tipo, pode ser utilizada para estabelecer relações filogenéticas (Klaus et al. 2009). O tipo de empacotamento espermatofórico encontrado nos Trichodactylidae pode estar mais relacionado a diferentes mecanismos de deiscência como proposto para *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius, 1788) por Beninger et al. (1993).

Os espermatozoides das espécies investigadas neste estudo (Tabela 1) apresentaram morfologia típica de Eubrachyura (Jamieson 1994), como os caranguejos de água doce Potamonautidae e Potamidae (Guinot et al. 1997; Klaus et al. 2009) e Gecarcinucidae (Klaus et al. 2009; Klaus & Brandis 2011). Apesar de apresentarmos três espécies, de gêneros distintos da família Trichodactylidae, as diferenças morfológicas observadas podem ser utilizadas como ferramenta taxonômica, bem como confrontados com dados moleculares para se hipotetizar as relações filogenéticas entre gêneros e espécies em trichodactilídeos.

Estruturas homólogas dos espermatozoides de *D. pagei*, *Z. oronensis* e *V. serrata* variam significativamente ao nível de gênero, podendo estas estruturas serem utilizadas como ferramenta taxonômica. O espermatozoide de *D. pagei* é similar ao encontrado em *D. septemdentatus*, com pequenas variações na câmara perforatorial, sendo ambos com formato panduriforme, porém com ápice mais estreito em *D. septemdentatus* (Matos et al. 1996). Estes mesmos autores propuseram que os espermatozoides de *D. septemdentatus* apresentam

diferentes estágios de maturação ao longo do vaso deferente anterior, médio e posterior. Entretanto, neste trabalho foram analisados espermatozoides provenientes da região anterior e média e nenhuma diferença morfológica foi observada. Além disso, é demonstrado que os espermatozoides em *D. pagei* e *S. pictus* estão completamente formados na zona de evacuação dos testículos (Oliveira & Zara, Capítulo I). Assim, é provável que os espermatozoides estejam formados também na zona de evacuação dos testículos em *D. septemdentatus*, e as alterações pelos autores descritas seja engano de interpretação da imagem ao microscópio de contraste interdiferencial de fase.

A morfologia da câmara perforatorial em Trichodactylidae apresenta similaridades com os Potamonautidae, Potamidae e Gecarcinucidae. Entretanto, *Z. oronensis* e *V. serrata* apresentam depressões no ápice da câmara perforatorial, que não ocorre em outros caranguejos de água doce descritos (Guinot et al. 1997; Klaus et al. 2009; Klaus et al. 2011). A depressão da câmara perforatorial, associada a saliência no opérculo pode ser uma característica que distingue gêneros dentro de Trichodactylidae, uma vez que as três espécies estudadas pertencem à mesma subfamília (Ng et al. 2008), estando *Z. oronensis* e *V. serrata* filogeneticamente mais próximos. Não foram observados centríolos em nenhum dos tricodactilídeos, provavelmente devido ao plano de corte ou problemas de fixação em zonas tropicais (Klaus et al. 2009). Uma das características de Brachyura basais, as corrugações, foram observadas na câmara perforatorial dos espermatozoides dos tricodactilídeos analisados. Entretanto, as corrugações encontradas nos animais deste estudo apresentam invaginações da câmara perforatorial mais numerosas e profundas que nos Raninoidea (Jamieson 1994) e parecem estar associadas aos túbulos perforatoriais. As corrugações da câmara perforatorial podem ser uma característica plesiomórfica, porém modificada na linhagem de caranguejos de água doce das Américas, o que os difere da linhagem dos Potamonautidae, Potamidae e Gecarcinucidae.

O opérculo também apresentou variação significativa nas espécies analisadas no presente estudo, sendo ovoide em *D. pagei* e *D. septemdentatus*, deltoide em *V. serrata* e deltoide mais acentuado em *Z. oronensis*. Além disso, todas espécies apresentaram opérculo fechado, sendo mais delgada em *D. pagei* e *Z. oronensis*, e mais espessa em *V. serrata*. Tais características diferem dos Potamidae *Potamon fluviatile* (Herbst, 1785), *P. ibericum* e do Gecarcinucidae *J. singaporensis*, os quais possuem opérculo pouco ou não acentuados e perfurados (Klaus et al. 2009). Os opérculos dos espermatozoides de Trichodactylidae são mais similares aos Gecarcinucidae e ao Potamonautidae *Hydrothelphusa* aff. *madagascariensis* (A. Milne-Edwards, 1872), os quais apresentam opérculo mais acentuados e não perfurados (Klaus et al. 2009; Klaus et al. 2011). Apesar das similaridades do opérculo dos espermatozoides entre os grupos de caranguejos de água doce, a estrutura do opérculo, associada à câmara perforatorial estão mais relacionadas ao mecanismo de fertilização, cujas diferenças podem ser cruciais para explicar como estes mecanismos ocorrem em cada espécie (Beninger et al. 1988).

A morfologia globular do acrossomo com três camadas com diferentes eletrodensidades é similar à de outros braquiuros, por exemplo, espécies da família Mithracidae MacLeay, 1838 estudados por Assugeni et al. 2017. Entretanto, os Trichodactylidae apresentaram características mais similares aos Potamonautidae, Potamidae e Gecarcinucidae (Guinot et al. 1997; Klaus et al. 2009), nos quais há ausência de estruturas lamelares concêntricas na camada externa do acrossomo e ausência de botão apical, o que pode indicar perda desta característica em animais mais derivados como os Grapsidae MacLeay, 1838 (Tiseo et al. 2017). A chanfradura a base lateral do acrossomo pode ainda ser outra característica autapomórfica para tricodactilídeos. As espécies investigadas neste estudo apresentaram tal característica, o que não foi observado em Potamonautidae, Potamidae e Gecarcinucidae. Entretanto, estudos sobre os espermatozoides de outros gêneros são necessários para confirmar esta hipótese.

O anel espessado na base da câmara perforatorial é bem desenvolvido em Trichodactylidae. Em *D. pagei* e *D. septemdentatus*, a camada interna do acrossomo inicia-se na extremidade opercular do anel espessado. Já em *Z. oronensis* e *V. serrata* apresentam morfologia mais próxima, na qual a camada interna do acrossomo recobre todo o anel espessado. Nos outros caranguejos de água doce como Potamonautidae, Potamidae e Gecarcinucidae, o anel espessado é delgado (Guinot et al. 1997; Klaus et al. 2009; Klaus et al. 2011), assim como o reportado em Grapsoidea, Portunoidea e Majoidea (ver Benetti et al. 2008; Stewart et al. 2010; Assugeni et al. 2017; Tiseo et al. 2017). Nos Potamidae e Gecarcinucidae, o anel espessado é delgado, mais similar ao que ocorre em animais marinhos. O fato de o anel espessado ser bem desenvolvido em Trichodactylidae pode ser uma característica que distingue este grupo das outras linhagens de caranguejos de água doce (Tsang et al. 2014).

Nos Trichodactylidae aqui investigados, bem como em *D. septemdentatus* descrito por Matos et al. (1996), os espermatozoides apresentam uma placa núcleo-citoplasmática elétron-densa. Em *D. pagei*, esta estrutura apresenta lamelas, o que não pode ser observado em *D. septemdentatus* devido a falta de detalhes da descrição (ver Matos et al. 1996). Em *Z. oronensis* e *V. serrata* a placa núcleo-citoplasmática não apresenta lamelas, sendo homogênea por toda sua extensão. Tal estrutura parece ser uma característica que mostra que *Z. oronensis* está filogeneticamente mais próximo a *V. serrata* que a *D. pagei*. Entretanto, tal hipótese poderá ser confirmada com o avanço em estudos com base em dados moleculares.

O presente estudo apresentou o primeiro registro de espermatóforos cleistospérmicos em Trichodactylidae, que anteriormente havia sido proposto exclusivamente para Potamidae por Guinot et al. (1997). Apesar de *Z. oronensis* e *V. serrata* apresentarem tanto espermatóforos coenospérmicos, quanto cleistospérmicos, ainda não foi possível obter dados com propriedades taxonômicas para os tricodactilídeos devido ao número de espécies investigadas. A placa núcleo-citoplasmática espessa elétron-densa, bem como a chanfradura na base lateral do

acrossomo dos espermatozoides são provavelmente autapomorfias para Trichodactylidae. *Dilocarcinus pagei* e *D. septemdentatus* apresentaram morfologia dos espermatozoides similar, diferindo de *Z. oronensis* e *V. serrata* que compartilham maior número de características, estando filogeneticamente mais próximos. Tal hipótese poderá ser reforçada por estudos com base em dados filogenéticos para a família Trichodactylidae. Apesar da morfologia dos espermatozoides apresentarem características similares entre Trichodactylidae e outras famílias de água doce, a autapomorfia apresentada nos espermatozoides dos tricodactilídeos avaliados não descartam a hipótese do surgimento de duas linhagens independentes de caranguejos de água doce.

## Referências

- Assugeni CO, Magalhães T, Bolaños JA, Tudge CC, Mantelatto FL, Zara FJ. 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.
- Bauer RT, Cash CE. 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: 144–162.
- Benetti AS, Santos DC, Negreiros-Fransozo ML, Scelzo MA. 2008. Spermatozoal ultrastructure in three species of the genus *Uca* Leach, 1814 (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Micron* 39: 337–343.
- Beninger PG, Elner RW, Foyle TP, Odense PH. 1988. Functional anatomy of the male reproductive system and the female spermatheca in the snow crab *Chionoecetes opilio*

- (O. Fabricius) (Decapoda: Majidae) and a hypothesis for fertilization. *Journal of Crustacean Biology* 8: 322–332.
- Beninger PG, Lanteigne C, Elnor RW. 1993. Reproductive processes revealed by spermatophore dehiscence experiments and by histology, ultrastructure, and histochemistry of the Female reproductive system in the snow crab *Chionoecetes opilio* (O. Fabricius). *Journal of Crustacean Biology* 13: 1–16.
- Camargo TR, Rossi N, Castilho AL, Costa RC, Mantelatto FL, Zara FJ. 2015. 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 TR, Rossi N, Castilho AL, Costa RC, Mantelatto FL, Zara FJ. 2017. Sperm ultrastructure of shrimps from the family Penaeidae (Crustacea: Dendrobranchiata) in a phylogenetic context. *Arthropod Structure & Development* 46: 588–600.
- Castilho GG, Ostrensky A, Pie MR, Boeger WA. 2008. Morphology and histology of the male reproductive system of the mangrove land crab *Ucides cordatus* (L.) (Crustacea, Brachyura, Ocypodidae). *Acta Zoologica* 89: 157–161.
- Clopton RE. 2004. Standard nomenclature and metrics of plane shapes for use in gregarine taxonomy. *Comparative Parasitology* 71: 130–140.
- Erkan M, Tunali Y, Sancar-Bas S. 2009. Male reproductive system morphology and spermatophore formation in *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) (Decapoda: Astacidae). *Journal of Crustacean Biology* 29: 42–50.
- Guinot D, Jamieson BGM, Tudge CC. 1997. Ultrastructure and relationships of spermatozoa of the freshwater crabs *Potamon fluviatile* and *Potamon ibericum* (Crustacea, Brachyura, Potamidae). *Journal of Zoology* 241: 229–244.

- Jamieson BGM. 1994. Phylogeny of the Brachyura with particular reference to the Podotremata: Evidence from a review of spermatozoal ultrastructure (Crustacea, Decapoda). *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 345: 373–393.
- Jamieson BGM, Tudge CC. 2000. 1. Crustacea – Decapoda. In: Jamieson BGM, editor. *Progress in male gamete ultrastructure and phylogeny*, vol. 9. part c of Adiyodi KG, Adiyodi RG, editors. *Reproductive Biology of Invertebrates*. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 1–95.
- Jeyalectumie C, Subramoniam T. 1987. Biochemical composition of seminal secretions with special reference to LDH activity in the reproductive tissues of the field crab, *Paratelphusa hydrodromous* (Herbst). *Experimental Biology* 46: 231–236.
- Klaus S, Brandis D. 2011. Evolution of sperm morphology in potamid freshwater crabs (Crustacea: Brachyura: Potamoidea). *Zoological Journal of the Linnean Society* 161: 53–63.
- Klaus S, Münzner S, Modenbach AC, Streit B, Tudge CC. 2011. Spermatophore formation and sperm ultrastructure of *Sundathelphusa philippina* (Crustacea: Brachyura: Gecarcinucidae). *Acta Zoologica* 20: 1–6.
- Klaus S, Schubart CD, Brandis D. 2009. Ultrastructure of spermatozoa and spermatophores of old world freshwater crabs (Brachyura: Potamoidea: Gecarcinucidae, Potamidae, and Potamonautidae). *Journal of Morphology* 270: 175–193.
- 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.
- Ng P, Guinot D, Davie P. 2008. *Systema Brachyurorum: Part I. An annotated checklist of extant brachyuran crabs of the world*. *The Raffles Bulletin of Zoology* 17: 1–286.

- Oliveira LJF, Zara FJ. Morfologia do sistema reprodutor masculino, espermatogênese e produção de fluido seminal em *Dilocarcinus pagei* e *Sylviocarcinus pictus* (Decapoda: Trichodactylidae): existe formação de “plug” espermático? Dissertação de Mestrado: Capítulo I.
- Reynolds ES. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology* 17: 208–212.
- Stewart MJ, Stewart P, Soonklang N, Linthong V, Hanna PJ, Duan W, Sobhon P. 2010. Spermatogenesis in the blue swimming crab, *Portunus pelagicus*, and evidence for histones in mature sperm nuclei. *Tissue and Cell* 42: 137–150.
- Tiseo GR, Mantelatto FL, Zara FJ. 2014. Is cleistosperry and coenospermy related to sperm transfer? A comparative study of the male reproductive system of *Pachygrapsus transversus* and *Pachygrapsus gracilis* (Brachyura: Grapsidae). *Journal of Crustacean Biology* 34: 704–716.
- Tiseo GR, Mantelatto FL, Zara FJ. 2017. Ultrastructure of spermatophores and spermatozoa of intertidal crabs *Pachygrapsus transversus*, *Pachygrapsus gracilis* and *Geograpsus lividus* (Decapoda: Grapsidae). *Zoologischer Anzeiger* 269: 166–176.
- Tudge CC. 1991. Spermatophore diversity within and among the hermit crab families, Coenobitidae, Diogenidae, and Paguridae (Paguroidea, Anomura, Decapoda). *Biological Bulletin* 181: 238–247.
- Tudge CC. 2009. Spermatozoal morphology and its bearing on decapod phylogeny. In: Martin JW, Crandall KA, Felder DL, editors. *Decapod Crustacean Phylogenetics*. CRC Press, Taylor and Francis Group, London, pp. 101–119.
- Tudge CC, Scheltinga DM, Jamieson BGM, Guinot D, Forges BR. 2014. Comparative ultrastructure of the sperm of the Majoidea (Crustacea, Decapoda, Brachyura) with new data on six species in five genera. *Acta Zoologica* 95: 1–20.

Tsang LM, Schubart CD, Ahyong ST, Lai JCY, Au EYC, Chan TY, Ng PKL, Chu KH. 2014.

Evolutionary history of true crabs (Crustacea: Decapoda: Brachyura) and the origin of freshwater crabs. *Molecular Biology and Evolution* 31: 1173–1187.

Zara FJ, Toyama MH, Caetano FH, López-Greco LS. 2012. Spermatogenesis, spermatophore, and seminal fluid production in the adult blue crab, *Callinectes danae* (Portunidae). *Journal of Crustacean Biology* 32: 249–262.

**Lista de Tabela**

Tabela 1 – Características ultraestruturais dos espermatóforos e espermatozoides observados em *Dilocarcinus pagei*, *Zilchiopsis oronensis*, *Valdivia serrata* e *Dilocarcinus septemdentatus*. A terminologia para a morfologia dos espermatozoides foi obtida de acordo com Jamieson (1994), Guinot et al. (1997), Klaus et al. (2009), Tudge et al. (2014) e Tiseo et al. (2017).

Características		<i>Dilocarcinus pagei</i>	<i>Dilocarcinus septemdentatus</i> *	<i>Zilchiopsis oronensis</i>	<i>Valdivia serrata</i>
Espermatóforo	Tipo	Coenospermia		Cleistospermia / Coenospermia	
	Morfologia	Elipsoide / Esférico			
	Parede	Simples			Duas camadas
	Quantidade	Variável			
Vesícula acrossomal	Zona acrossomal	Concêntrica (3 camadas)			
	Camada interna	Deltoide / Contínua com o anel espessado		Ampuliforme / Recobrindo o anel espessado	Luniforme / Recobrindo o anel espessado
	Camada externa	Larga / Granular			
	Camada periférica	Delgada			
	Lamelas concêntricas	Ausente			
	Base lateral**	Leve chanfradura	Não observado	Chanfradura pouco acentuada	Chanfradura profunda
Opérculo	Tipo	Não perfurado			
	Projeções	Ausente			
	Espessura	Delgado			Espesso
	Anel periopercular	Ausente			
	Anel opercular acessório	Presente			
	Protuberância do material subopercular	Ausente			
Botão apical		Ausente			
Câmara perforatorial	Morfologia	Panduriforme			Oblongo
	Ápice	Oblongo	Estreitamente oblongo	Romboide	Piriforme
	Conteúdo	Túbulos perforatoriais			
	Corruções da parede**	Numerosas / Pouco profundas	Não observado	Pouco numerosas / Profundas	Pouco numerosas / Profundas

Anel espessado**	Espesso / Finalizado na região média da base do acrossomo		Espesso / Estende-se por toda base do acrossomo
Anel Xanthidae	Ausente		
Cápsulas	Ausente		
Projeções capsulares	Ausente		
Câmara capsular	Ausente		
Centríolos	Não observado		
Braços laterais	Presente		
Aspecto da cromatina	Fibrilar		
Processo mediano posterior	Ausente		
Placa núcleo-citoplasmática**	Espessa / Elétron-densa		
Lamaelas na placa núcleo citoplasmática**	Presente	Não observado	Ausente
Mitocôndria	Presente		

\*Dados obtidos a partir de Matos et al. (1996); \*\*Caráter exclusivo de Trichodactylidae.

## Lista de Figuras

Figura 1. Micrografia eletrônica de transmissão do espermatóforo e espermatozoide de *Dilocarcinus pagei*.

A, Vista geral da morfologia do espermatóforo em coenospermia de *D. pagei*. Notar a parede do espermatóforo elétron-densa. B, Detalhe da parede do espermatóforo formada por uma única camada de secreção elétron-densa. C, Corte longitudinal do espermatozoide de *D. pagei* imerso em matriz extracelular mais elétron-lúcida que a exterior ao espermatóforo. Notar a placa núcleo-citoplasmática elétron-densa delimitando a cromatina com aspecto fibrilar (seta branca). D, Detalhe do opérculo fechado delgado recobrimdo a câmara perforatorial, estendendo-se lateralmente sobre o acrossomo. Notar a camada subopercular menos elétron-densa, estendendo-se até o anel subopercular. E, Detalhe do anel subopercular menos elétron-denso e logo abaixo da projeção do opérculo. Notar as camadas interna, externa e periférica do acrossomo. F, Detalhe da base da câmara perforatorial com o anel espessado e placa núcleo-citoplasmática elétron-densa (seta branca). Cabeça de seta branca indica a leve chanfradura na base lateral do acrossomo. Notar os túbulos perforatórios em disposição perpendicular (cabeça de seta preta) e as lamelas na placa núcleo-citoplasmática (seta branca). G, Corte transversal do espermatozoide. Notar a câmara perforatorial no centro, envolta pelas camadas interna, externa e periférica do acrossomo. H, Detalhe das reentrâncias da membrana no sentido interno da câmara perforatorial. Ar = braços radiais; Cy = citoplasma; In = camada interna do acrossomo; Mt = mitocôndria; N = núcleo; O = opérculo; Oa = camada externa do acrossomo; P = câmara perforatorial; Pa = zona periférica do acrossomo; Sl = camada subopercular; Sr = anel opercular acessório; SW = parede do espermatóforo; SZ = espermatozoide; Tr = anel espessado.

Figura 2. Micrografia eletrônica de transmissão do espermatóforo e espermatozoide de *Zilchiopsis oronensis*.

A, Vista geral da morfologia dos espermatóforos em coenospermia de *Z. oronensis*. Parede do espermatóforo elétron-densa e espessa e secreção do interior do espermatóforo mais elétron-lúcida que a exterior. B, Espermatóforo de *Z. oronensis* em cleistospermia. C, Corte longitudinal do espermatozoide de *Z. oronensis* imerso em matriz extracelular mais elétron-lúcida que a exterior ao espermatóforo. Seta branca indica a placa núcleo-citoplasmática elétron-densa. D, Detalhe do ápice da câmara perforatorial, opérculo fechado que estende-se lateralmente sobre o acrossomo. Notar o material subopercular e chanfradura no opérculo (cabeça de seta branca) próximo ao ápice da câmara perforatorial. Cabeças de seta preta indicam os túbulos perforatoriais. E, Detalhe do anel subopercular menos elétron-denso e logo abaixo da projeção do opérculo. Notar chanfradura do opérculo (cabeça de seta branca) e túbulos perforatoriais (cabeça de seta preta). F, Base da câmara perforatorial com o anel espessado e túbulos perforatoriais em posição perpendicular (cabeça de seta preta). Notar a leve chanfradura na base do acrossomo (cabeça de seta branca) e placa núcleo-citoplasmática elétron-densa (seta branca). G, Corte transversal do espermatozoide de *Z. oronensis*. Notar a câmara perforatorial no centro, envolta pelo anel espessado extremamente elétron-denso, seguido pelas camadas interna, externa e periférica do acrossomo. H, Detalhe da câmara perforatorial com reentrâncias da membrana para o sentido interno. Ar = braços radiais; Cy = citoplasma; In = camada interna do acrossomo; Mt = mitocôndria; N = núcleo; O = opérculo; Oa = camada externa do acrossomo; P = câmara perforatorial; Pa = zona periférica do acrossomo; Sl = camada subopercular; Sr = anel opercular acessório; SW = parede do espermatóforo; SZ = espermatozoide; Tr = anel espessado.

Figura 3. Micrografia eletrônica de transmissão do espermatóforo e espermatozoide de *Valdivia serrata*.

A, Vista geral da morfologia do espermatóforo em coenospermia de *V. serrata*. A parede do espermatóforo é elétron-densa e espessa, e a secreção do interior do espermatóforo é mais elétron-lúcida que a exterior. B, Detalhe da parede do espermatóforo formada por duas camadas de secreção, uma elétron-densa mais espessa (cabeça de seta preta) e outra elétron-lúcida delgada. C, Espermatóforo de *V. serrata* em cleistospermia. D, Corte longitudinal do espermatozoide de *V. serrata* em matriz extracelular. Seta branca indica o envelope nuclear delimitando a cromatina. E, Detalhe do opérculo fechado elétron-denso espesso estendendo-se lateralmente sobre o acrossomo. Notar chanfradura próxima ao ápice câmara perforatorial (cabeça de seta branca) e túbulos perforatoriais (cabeça de seta preta). Notar também a camada subopercular em forma de delta menos elétron-densa, estendendo-se até o anel subopercular. Cabeças de seta preta indicam os túbulos perforatoriais. F, Anel subopercular sob o acrossomo. G, Detalhe da base da câmara perforatorial com o anel espessado e envelope nuclear (seta branca). Notar a chanfradura na base do acrossomo (cabeça de seta branca). H, Corte transversal do espermatozoide. Notar a câmara perforatorial no centro, envolta pelas camadas interna, externa e periférica do acrossomo. I, Detalhe da câmara perforatorial com reentrâncias da membrana para sentido interno. Ar = braços radiais; Cy = citoplasma; In = camada interna do acrossomo; Mt = mitocôndria; N = núcleo; O = opérculo; Oa = camada externa do acrossomo; P = câmara perforatorial; Pa = zona periférica do acrossomo; Sl = camada subopercular; Sr = anel opercular acessório; SW = parede do espermatóforo; SZ = espermatozoide; Tr = anel espessado.

Figura 1

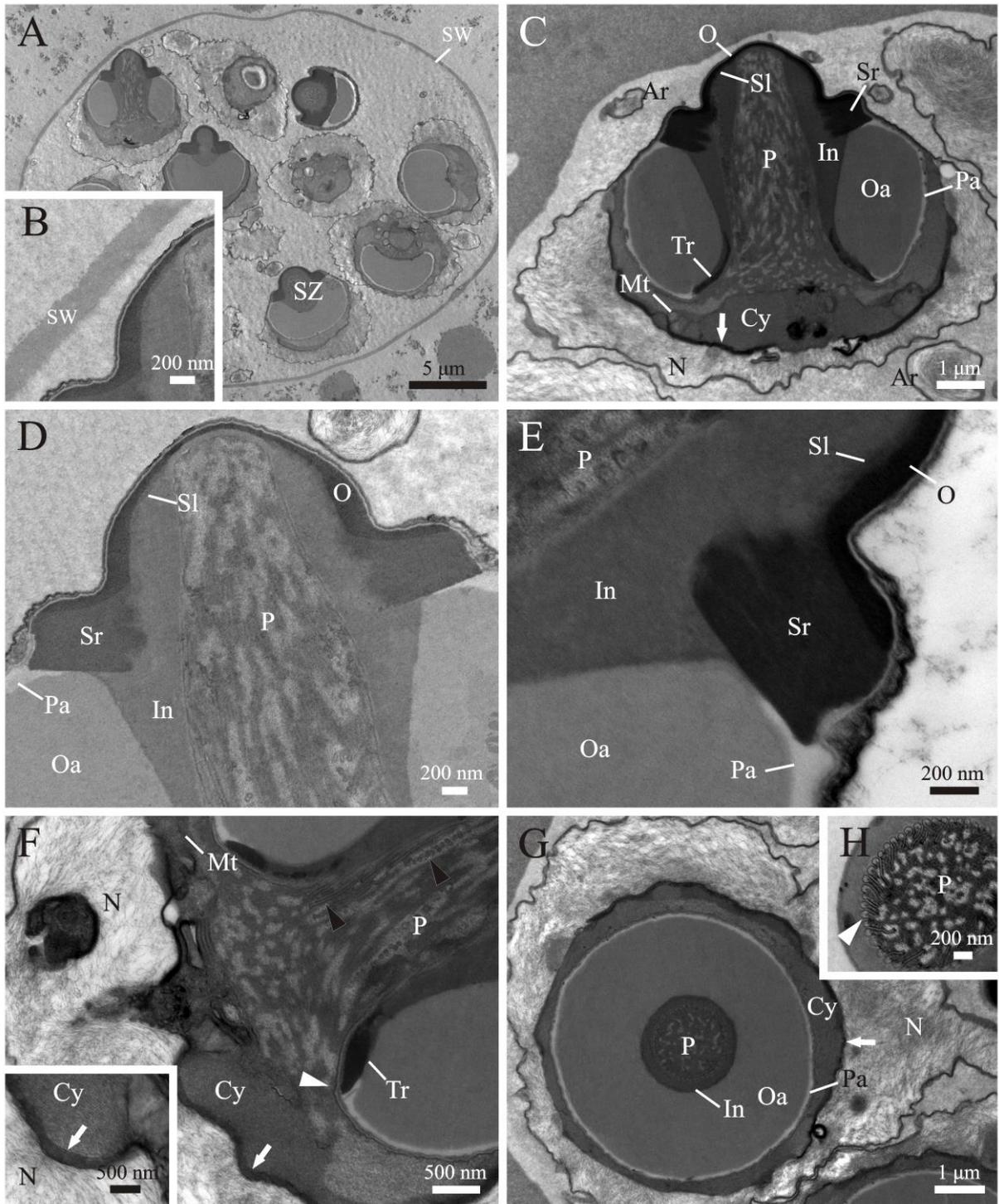


Figura 2

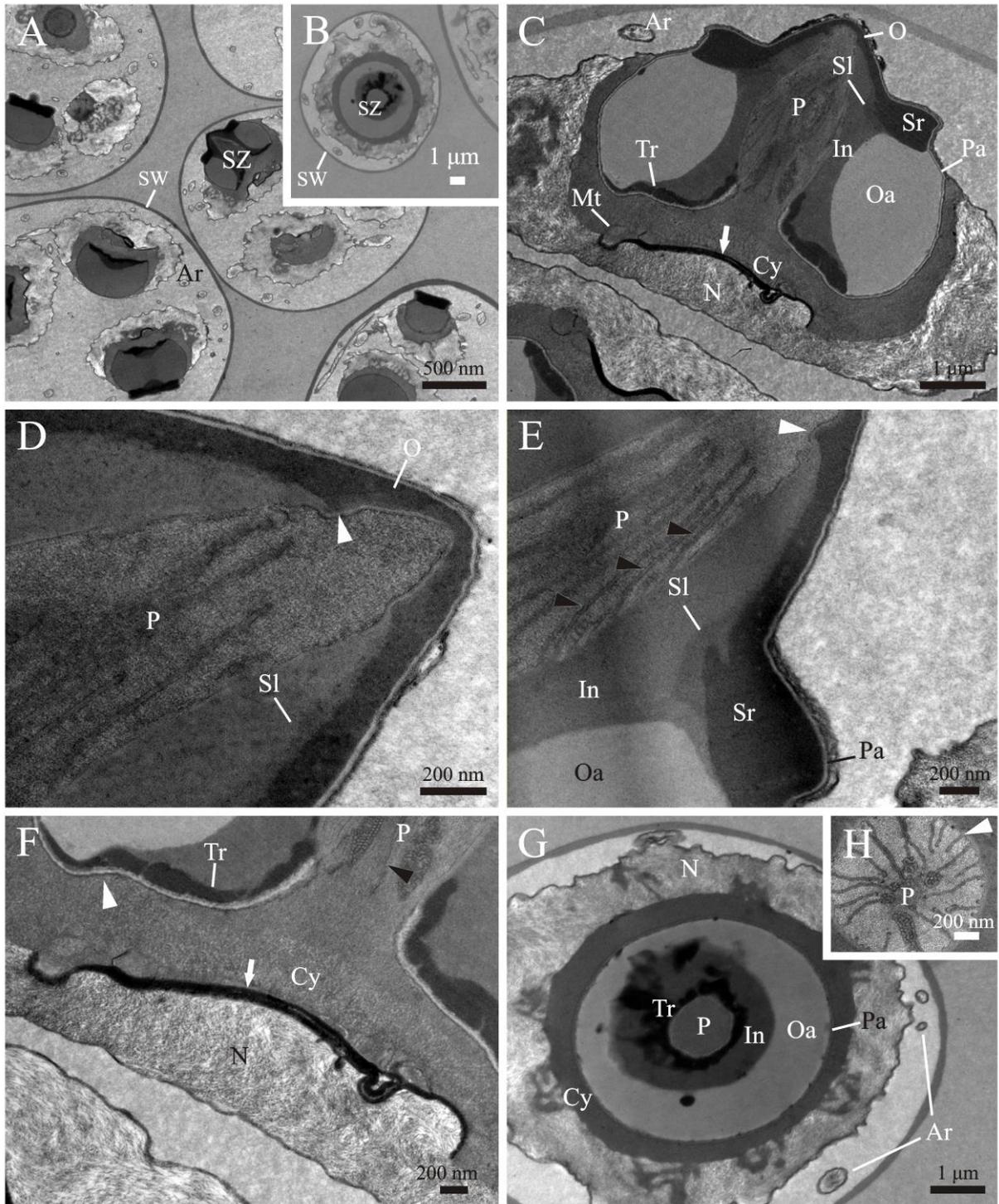
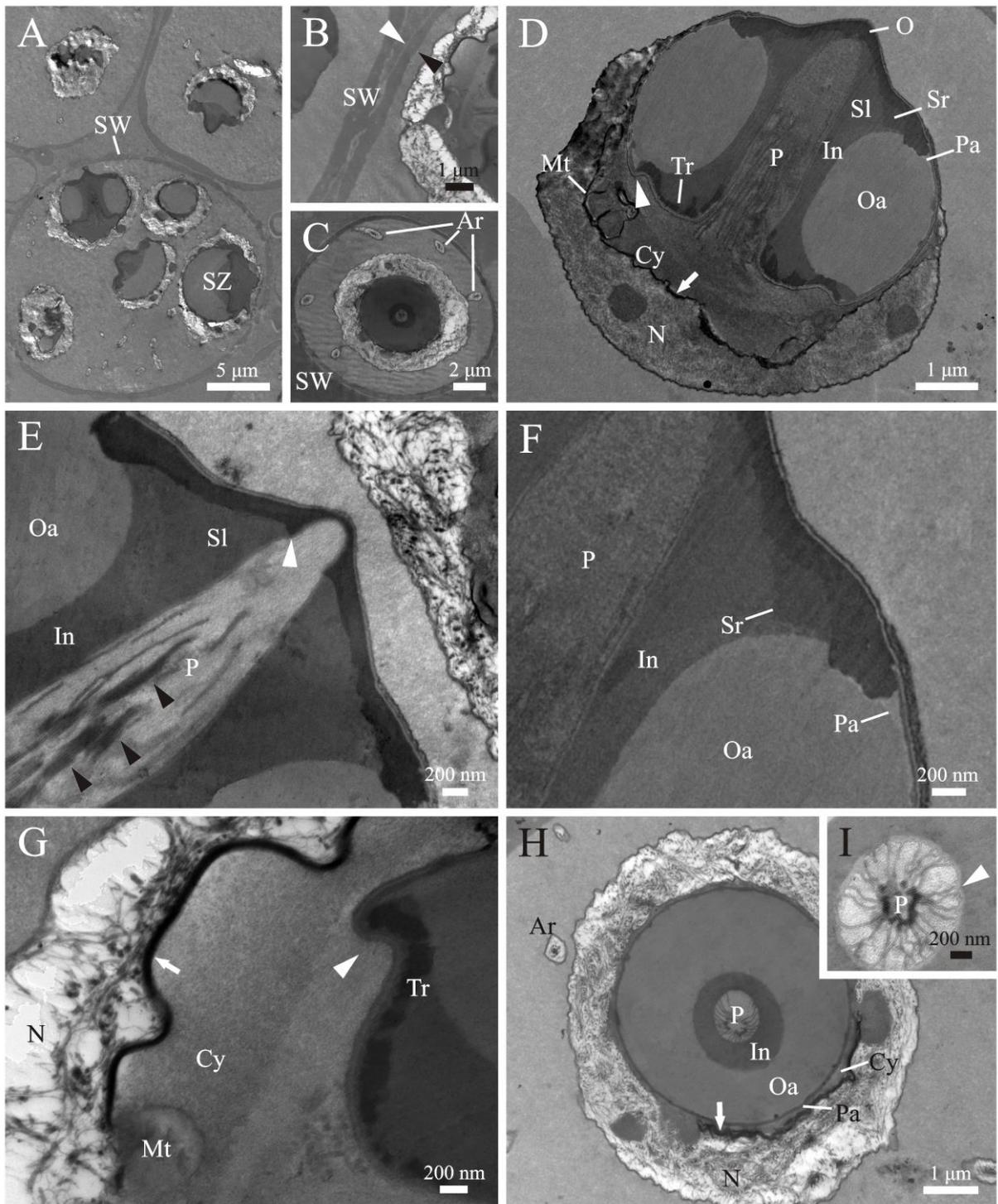


Figura 3



### **Considerações finais**

Este estudo apresenta pela primeira vez a descrição do sistema reprodutor masculino e espermatogênese de caranguejos de água doce da família Trichodactylidae. A morfologia do sistema reprodutor masculino é similar em *Dilocarcinus pagei* e *Sylviocarcinus pictus*, com exceção da quantidade de glândulas acessórias que é muito maior em *D. pagei*. Estas diferenças provavelmente estão relacionadas ao mecanismo de transferência espermática e competição reprodutiva. A espermatogênese ocorre de forma similar em ambas espécies, e apesar dos resultados ao microscópio de luz evidenciarem a formação dos espermátóforos no vaso deferente anterior distal, são necessários estudos ao microscópio eletrônico de transmissão para mostrar como os mecanismos de secreção estão envolvidos na formação dos espermátóforos e produção do fluido seminal.

A ultraestrutura dos espermátóforos e o fato de estes serem coenospérmicos ou cleistospérmicos podem não ser uma ferramenta taxonômica eficiente. Entretanto este estudo mostrou que a morfologia dos espermatozoides, devido as suas variabilidades interespecíficas, podem ser utilizadas como suporte para análises filogenéticas. Assim, são necessários outros estudos sobre a morfologia dos espermatozoides de caranguejos tricodactíledeos com mais de uma espécie por gênero para evitar falsas conclusões sobre as homologias dos caracteres obtidos nos espermatozoides. Novos estudos sobre este grupo podem auxiliar no entendimento dos mecanismos de transferência espermática, suas relações filogenéticas, bem como a transição do ambiente marinho para o dulcícola.