



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FELIPE ALECRIM DOURADO MOITINHO

SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE *CLIBANARIUS SCLOPETARIUS*
(HERBST, 1796) E *C. SYMMETRICUS* (RANDALL, 1840) (DECAPODA, ANOMURA,
DIOGENIDAE) E INFERÊNCIAS EM SUA BIOLOGIA REPRODUTIVA

FORTALEZA

2017

FELIPE ALECRIM DOURADO MOITINHO

SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE *CLIBANARIUS SCLOPETARIUS* (HERBST,
1796) E *C. SYMMETRICUS* (RANDALL, 1840) (DECAPODA, ANOMURA, DIOGENIDAE)
E INFERÊNCIAS EM SUA BIOLOGIA REPRODUTIVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas
do Centro de Ciências da Universidade Federal
do Ceará, como requisito parcial à obtenção do
grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Roberto Fei-
tosa Silva

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M723s Moitinho, Felipe Alecrim Dourado.
Sistema Reprodutor Masculino de *Clibanarius sclopetarius* (Herbst, 1796) e *C. symmetricus* (Randall, 1840) (DECAPODA, ANOMURA, DIOGENIDAE) e inferências em sua biologia reprodutiva / Felipe Alecrim Dourado Moitinho. – 2017.
46 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. José Roberto Feitosa Silva.

1. Reprodução. 2. Anomura. 3. Espermatóforo. 4. Histologia. I. Título.

CDD 570

FELIPE ALECRIM DOURADO MOITINHO

SISTEMA REPRODUTOR MASCULINO DE *CLIBANARIUS SCLOPETARIUS* (HERBST, 1796) E *C. SYMMETRICUS* (RANDALL, 1840) (DECAPODA, ANOMURA, DIOGENIDAE)
E INFERÊNCIAS EM SUA BIOLOGIA REPRODUTIVA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 07 de Dezembro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Roberto Feitosa Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Ana Valêsca Pinto de Lima
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profa. Dra. Carminda Sandra Brito Salmito Vanderley
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

À minha mãe e aos meus irmãos Rafa, Ju e Léo
pela fé constante depositada em mim e uns nos
outros. Partimos sozinhos, cada um em sua jor-
nada, mas sempre estaremos juntos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor José Roberto, pela sua confiança e paciência em todo o período em que me orientou.

À amiga Cynthia Ogawa por todo o ensinamento enquanto minha coorientadora e pela participação nesse trabalho.

Aos amigos da graduação, especialmente a Marina que esteve comigo desde o início e foi uma grande parceira e cúmplice nessa jornada.

Aos amigos do Laboratório de Estudos em Ecossistema aquáticos, em especial o Victor pelas conversas grandiosas e acalmadoras.

Ao meu grande amigo do ensino médio, Agnaldo, que se fez presente ainda que distante.

Ao pescador, Ronaldo pela ajuda nas coletas e à toda a comunidade do Cumbe pelo ambiente acolhedor.

À minha mãe, Sueli, por todo o apoio nessa e em todas as etapas da minha vida e aos meus irmãos que sempre acreditaram em mim. E ao meu pai por me mostrar como se manter otimista mesmo em momentos difíceis.

Aos companheiros de laboratório Yago, Hipólito e Júlia.

Aos professores do departamento de Biologia.

“Diga, meu amor, pois eu preciso escolher
Apagar as luzes, ficar perto de você
Ou aproveitar a solidão do amanhecer
Prá ver tudo aquilo que eu tenho que saber”

(Raul Seixas)

RESUMO

Foram feitas descrições do sistema reprodutor masculino completo de *Clibanarius sclopetarius* e *Clibanarius symmetricus* e inferências sobre sua biologia reprodutiva. Animais foram coletados a mão no estuário do Rio Jaguaribe. Aspectos externos e internos da morfologia do sistema reprodutor masculino foram analisados macroscopicamente e sobre microscopia de luz. O sistema reprodutor consiste em um par de testículos e de vasos deferentes. Os testículos são lobulares e sem comissura entre eles. Macroscopicamente os vasos deferentes são divididos em uma região proximal curta, fina e enovelada, uma mediana mais espessa e enovelada e uma distal, curta, espessa e reta. Os gonóporos são aberturas circulares com cerdas curtas e simples. Não existem apêndices ou estruturas especializada na transferência de esperma. Microscopicamente, os testículos apresentam vários lóbulos unidos por um córtex fibroso e apresentam uma zona de transformação contendo células germinativas e um ducto coletor onde espermatozoides são depositados. Os vasos deferentes são divididos em três regiões, proximal, que secreta a parede do espermatóforo e secreções seminais, mediana, molda os espermatóforos e secreta material glicoproteico que os envolve e distal armazena os espermatóforos e secreta materiais seminais. Os espermatóforos consistem em ampolas e projeções laterais, sem pedúnculo e pedestal. A morfologia dos testículos se assemelha a de outros crustáceos. O processo de formação dos espermatóforos ocorre de forma diferente da observada em outros caranguejos ermitões. A morfologia dos espermatóforos é diferente da observada na maioria da família Diogenidae. A morfologia do espermatóforo e dos gonóporos, bem como os tipos de materiais secretados pelos vasos deferentes permitem inferir que a cópula desses animais ocorrem pela deposição da massa espermatofórica no cefalotórax das fêmeas, com fecundação externa.

Palavras-chave: Reprodução. Anomura. Espermatóforo. Histologia.

ABSTRACT

Descriptions of the complete male reproductive system of *textit* *Clibanarius sclopetarius* and *textit* *Clibanarius symmetricus* and inferences on its reproductive biology have been made. Animals were collected by hand in the estuary of the Jaguaribe River. External and internal aspects of the male reproductive system morphology were analyzed macroscopically and on light microscopy. The reproductive system consists of a pair of testicles and vas deferens. The testicles are lobular and without commissure between them. Macroscopically the vas deferens are divided into a short, thin, coiled proximal region, a thicker and coiled median region, and short, thick and straight distal region. The gonopores are circular openings with short and simple setae. There are no specialized structures or appendices in sperm transfer. Microscopically, the testicles present several lobes joined by a fibrous cortex and present a transformation zone containing germ cells and a collecting duct where sperm are deposited. The vas deferens are also divided into three regions, proximal, which secretes the spermatophore wall and seminal secretions, median, molds the spermatophores and secretes glyphrotic material that surrounds them and distal stores the spermatophores and secretes seminal materials. Spermatophores consist of ampulae and lateral projections, without peduncle and pedestal. The morphology of the testicles resembles that of other crustaceans. The process of spermatophore formation occurs differently from that observed in other hermit crabs. The morphology of spermatophores differs from that observed in most of the Diogenidae family. The morphology of the spermatophore and gonopores, as well as the types of materials secreted by the vas deferens allow to infer that the copula of these animals occur by the deposition of the spermatophore mass in the cephalothorax of the females, with external fertilization.

Keywords: Reproduction. Anomura. Spermatophore. Histology.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Vista dorsal de indivíduos. A. *Clibanarius symmetricus* B. *C. sclopetarius*. Abdome torcido e não calcificado, não fusionado ao ultimo segmento torácido, formando uma cintura (seta) entre abdome e cefalotórax , com pleópodes ímpares. Quelípodes semi-iguais. Identificação das espécies pelas faixas nos pereiópodes. 23
- Figura 2 – Vista ventral de indivíduos. A. Gonóporo masculino localizado nas coxas do quinto par de pereiópodes (pereiópodes números do 1^o ao 5^o par). B. Detalhe dos gonóporos apresentando um opérculo membranoso. C. Detalhe de um único gonóporo com opérculo membranoso e rodeado por cerdas curtas (setas). 24
- Figura 3 – Fotos da dissecação dos indivíduos. A. Posicionamento do sistema reprodutor masculino no abdome, dorsalmente ao hepatopâncreas (h). B. Após retirada do sistema reprodutor, possibilitando a visualização dos testículos lobulares e um vaso deferente com três regiões, um vaso deferente proximal (VDP) curto, vaso deferente mediano (VDM) longo e enovelado e um vaso deferente distal (VDD) reto. 25
- Figura 4 – Fotomicrografias do Sistema Reprodutor Masculino. Testículo. A. Visão geral do testículo com vários lóbulos formados por uma zona de transformação (ZT) com células germinativas e um ducto coletor (DC) com espermatozoides e S1. B. Detalhe da periferia dos lóbulos, com um epitélio simples escamoso e células acessórias próximas a ele. C. Testículo revestido por uma membrana fibrosa (seta). 27
- Figura 5 – Fotomicrografias do Sistema Reprodutor Masculino. Células germinativas. A, Espermátogônia. B, Espermátócito. C, Espermátide inicial. D, Espermátide final. 28
- Figura 6 – Fotomicrografias do Sistema Reprodutor Masculino. Espermatozoides A e C, *Clibanarius sclopetarius*. B e D, *Clibanarius symmetricus*. A e B, Testículo. C e D, Vaso Deferente Distal. Espermatozoides formados por uma vesícula acrossomal esférica contendo um *perforatorium* e ao redor deste, um anel do *perforatorium* (setas). No ápice, um opérculo basófilo. 29

Figura 7 – Fotomicrografias do Sistema Reprodutor Masculino. Vaso deferente proximal. A, VDP inicial. B, VDP final.	31
Figura 8 – Fotomicrografias do Sistema Reprodutor Masculino. Vaso Deferente Mediano. A, seção transversão mostrando o acumulo de S4 e dos espermatóforos em um lado do vaso. B, secção longitudinal evidenciando as diferenças entre os lado côncavo e convexo do vaso. C e D, detalhes de B.	32
Figura 9 – Fotomicrografias do Sistema Reprodutor Masculino. Vaso Deferente Distal. Camada interna formada por um epitélio cúbico secretor da S5 e camada externa muscular espessa.	33
Figura 10 – Espermatóforo de <i>Clibanarius symmetricus</i> A. Espermatóforos unidos lateralmente formam um cordão de espermatóforos. B. Detalhe do espermatóforo, formado por uma ampola com projeções laterais e uma invaginação basal. .	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Origem e reação das secreções do sistema reprodutor masculino aos reagentes utilizados.	33
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

S1	Secreção 1
S3	Secreção 3
S4	Secreção 4
S5	Secreção 5
SRM	Sistema Reprodutor Masculino
SW	Parede do Espermatóforo
VD	Vaso Deferente
VDD	Vaso Deferente Distal
VDM	Vaso Deferente Mediano
VDP	Vaso Deferente Proximal
VDPf	VDP final
VDPi	VDP inicial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
3	METODOLOGIA	22
3.1	Coleta dos animais	22
3.2	Laboratório	22
4	RESULTADOS	23
4.1	Identificação das Espécies	23
4.2	Descrição do Sistema Reprodutor Masculino	23
4.2.1	<i>Aspectos Macroscópicos</i>	24
4.2.2	<i>Aspectos Microscópicos</i>	26
4.2.2.1	<i>Testículo</i>	26
4.2.2.2	<i>Vaso deferente e formação do espermátóforo</i>	28
4.2.2.2.1	<i>Vaso Deferente Proximal(VDP)</i>	28
4.2.2.2.2	<i>Vaso Deferente Mediano (VDM)</i>	30
4.2.2.2.3	<i>Vaso Deferente Distal (VDD)</i>	30
4.2.3	<i>Morfologia do Espermátóforo</i>	32
5	DISCUSSÃO	35
5.1	Aspectos Macroscópicos	35
5.2	Aspectos microscópicos	37
5.2.1	<i>Testículos</i>	37
5.2.2	<i>Vasos deferentes</i>	38
5.2.3	<i>Espermátóforos</i>	40
6	CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

O modo de reprodução e outros aspectos da biologia reprodutiva de qualquer animal, reflete na morfologia do seu sistema reprodutor. Portanto, para adquirir uma melhor compreensão dos mecanismos de reprodução, é importante conhecer a morfologia do seu sistema reprodutivo (SHINOZAKI-MENDES *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2013) Em crustáceos decápodes, o sistema reprodutor masculino consiste em um par de testículos e um par de vasos deferentes (VD) que termina nos gonóporos localizados no quinto par de pereiópodes (KROL *et al.*, 1992).

Os testículos são formados por numerosos túbulos seminíferos ou lóbulos onde os espermatozoides são formados por divisões sucessivas das células germinativas e depois liberados para o ducto colector para serem transferidos para o VD (KROL *et al.*, 1992) . Os espermatozoides são então envolvidos em secreções das células do VD para formar o espermatóforo (KROL *et al.*, 1992; SUBRAMONIAM, 1993).

Os espermatozoides de quase todos os crustáceos e de todos os decápodes, são aflagelados e imóveis. A transferência para as fêmeas é feita através dos espermatóforos, cujas funções estão relacionadas a proteção contra estresses ambientais, proporção de um substrato rico que pode manter os espermatozoides viáveis por mais tempo e agrupar os espermatozoides para facilitar a passagem para as fêmeas (KROL *et al.*, 1992; SUBRAMONIAM, 1993). Em alguns crustáceos, como os Brachyura, existem apêndices especializados para a transferência dos espermatóforos, os quais são depositados diretamente no interior dos gonóporos femininos. Nesse grupo, a função dos espermatóforos é apenas manter os espermatozoides juntos para serem transferidos mais facilmente o que reflete em sua estrutura, sendo os espermatóforos dos Brachyura os mais simples dentre os decápodes, consistindo geralmente de apenas uma massa sem forma ou tamanho específicos contendo os espermatozoides (SUBRAMONIAM, 1993). A maioria dos paguróides, por outro lado, com poucas exceções (TUDGE; LEMAITRE, 2004), não apresenta nenhuma estrutura especializada envolvida na transferência de esperma e os espermatóforos desse grupo são os mais complexos e diversificados entre todos os crustáceos. A transferência é feita depositando a massa espermatofórica na superfície ventral do cefalotórax das fêmeas ou das conchas de gastrópodes utilizadas por elas, onde mantém-se ligado até a fecundação ser completa, auxiliada por uma secreção seminal adesiva (TUDGE, 1991; SUBRAMONIAM, 1993; HESS; BAUER, 2002).

Tanto a ultraestrutura dos espermatozoides quanto a morfologia do espermatóforo têm sido amplamente utilizadas em estudos filogenéticos, dada a sua grande diversidade e

especificidade (TUDGE, 1991; TUDGE, 1997; TUDGE, 2009) . O espermatozoide de Anomura é característico por sua vesícula acrossomal esférica e a presença de três braços microtubulares, enquanto a presença de um denso anel do *perforatorium* em torno do bulbo perforatorial posterior é específica do gênero *Clibanarius* (TUDGE, 1997) . Quase toda a superfamília Paguroideae apresenta um espermatóforo tripartido com três estruturas distintas: uma ampola esférica, uma fina haste ou pedúnculo e um pedestal (TUDGE, 1991) .

Embora a especificidade dessas estruturas seja conhecida, pouco esforço tem sido feito na compreensão de como essas singularidades são formadas e como elas se refletem nos órgãos onde elas são produzidas. Estudos morfológicos e histológicos comparativos no sistema reprodutivo completo destes animais são importantes para obter uma maior compreensão desses processos e, portanto, uma melhor interpretação da sua biologia reprodutiva (BURANELLI; MANTELATTO, 2012; SANTOS; MANTELATTO, 2011; SHINOZAKI-MENDES *et al.*, 2012).

Clibanarius sclopetarius (Herbst, 1796) e *C. symmetricus* (Randall, 1840) são duas espécies de caranguejo-ermitão (DECAPODA, ANOMURA, PAGUROIDEA) comumente encontradas juntas ao longo da costa brasileira (TURRA; LEITE, 2002; MELO, 1999).

Objetivos

Os objetivos desse trabalho são descrever a morfologia de todo o sistema reprodutor masculino dessas duas espécies macroscópica e microscopicamente e discutir como essas características morfológicas refletem na biologia reprodutiva das mesmas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

De acordo com Krol *et al.* (1992) a morfologia básica do Sistema Reprodutor Masculino (SRM) de crustáceos decápodes consiste em um par de testículos, onde ocorre a produção de espermatozoides e um par de Vaso Deferente (VD) onde ocorre a formação dos espermatóforos, geralmente divididos em três regiões, uma proximal, uma mediana e uma distal, que termina nos gonóporos localizados no quinto par de pereiópodes.

Em muitos grupos de decápodes, a fecundação é interna e os machos apresentam estruturas especializadas como pênis ou papilas genitais e gonópodes para a transferência do esperma diretamente para o interior dos gonóporos femininos (SUBRAMONIAM, 1993).

Becker *et al.* (2012) descreveu o sistema copulatório de três espécies de caranguejos europeus *Pinnotheres pisum*, *Pinnotheres pectunculi*, e *Nepinnotheres pinnothere*. Nessas espécies estão presentes dois pares de gonópodes formados pelos primeiros e segundos pares de apêndices do pléon e um pênis muscular formado por uma elongação dos ducto ejaculatório. Ravi *et al.* (2014) Também descreve uma projeção do ducto ejaculatório no siri *Portunus pelagicus* formando um pênis constituído de uma espessa camada de tecido muscular interna e uma fina camada de tecido conjunção externa que auxilia na transferência da massa de espermatóforos dos vasos deferentes para os gonópodes que então depositam a massa nos gonóporos femininos.

Segundo Subramoniam (1993) a fecundação em caranguejos-ermitões é sempre externa.

Tudge e Lemaitre (2004) descreveram tubos sexuais formados por projeções tanto do VDD como de elementos da coxa ao redor do gonóporo em *Micropagurus acantholepis*, mas não fizeram observações de como ocorre a cópula nesses animais, não estando claro se essa estrutura teria a função de colocar espermatóforo diretamente no gonóporo feminino ou não, mas sabe-se que essas estruturas estão ligadas à transferência de esperma.

Hess e Bauer (2002) descreveram a cópula de *Clibanarius symmetricus*. Nessa espécie, não existem estruturas especializadas para a transferência de esperma. O gonóporo masculino é uma abertura circular coberto por um opérculo e com cerdas periféricas. Uma massa de espermatóforos é depositada diretamente sobre o corpo da fêmea, próximo à região do gonóporo localizada na coxa do terceiro par de pereiópodes. À medida que os ovócitos saem dos gonóporos femininos, eles passam pela massa espermatófórica, causando a abertura dos espermatóforos e liberação dos espermatozoides.

Tirelli *et al.* (2007) também observou gonóporos cobertos por um opérculo mem-

branso e contendo cerdas para *Clibanarius erythropus*, assim como Tirelli *et al.* (2010) para *Paguristes eremita*, Buranelli *et al.* (2014) para *Dardanus insignis*, e SCELZO *et al.* (2004) para *Loxopagurus loxochelis*. Amadio e Mantelatto (2009) menciona uma membrana ovoide fechando os gonóporos masculinos de *Calcinus tibicen* e Santos e Mantelatto (2011) utilizaram o termo aba cuticular (*cuticular flap*) para a estrutura cobrindo o gonóporo de *Clibanarius sclopetarius*. Os dois termos são sinônimos do opérculo membranso descrito pelos outros autores.

Os testículos podem apresentar uma comissura conectando testículo direito e esquerdo, que pode ocorrer numa região mediana do órgão, dando a este uma forma de H, ou na extremidade, dando um aspecto de letra V (KROL *et al.*, 1992). Os testículos podem ser tubulares ou lobulares, com cada lobo do testículo podendo ser formado por vários túbulos ou lóbulos seminíferos ou por apenas um único túbulo muito enovelado (KROL *et al.*, 1992). De acordo com esse autor, a espermatogênese em testículos lobulares pode ser classificada como sincrônica quando existem células germinativas de apenas um estágio em uma seção do lóbulo ou assincrônica quando ocorrem células em estágios diferentes.

Em Caridea, Cobos *et al.* (2011) Manjón-Cabeza *et al.* (2011) estudaram o SRM de *Hippolyte inermis* e *Hippolyte niezabitowskii* e encontraram resultados semelhantes. Nessas espécies testículos pares e vasos deferentes também pares sem comissura entre eles são encontrados no cefalotórax, próximo ao coração. Os testículos apresentam regiões bem definidas com uma linha de diferenciação onde a espermatogênese começa a ocorrer da camada mais interna para a mais externa de cada testículo. O Vaso Deferente Proximal (VDP) é enovelado e produz as secreções que formam o espermatóforo, o Vaso Deferente Mediano (VDM) é reto e continua a secreção das substâncias secretadas no VDP. O Vaso Deferente Distal (VDD) volta a se enovelar e produz uma secreção proteica que engloba todo o conteúdo produzido pelas outras regiões. O espermatóforo consiste de um cilindro com parede em duas camadas, uma mucosa e outras com substâncias estruturais.

Poljaroen *et al.* (2010) estudou com detalhes a espermatogênese em *Macrobrachium rosenbergii*. Nessa espécie, os testículos apresentam uma capsula de tecido conjuntivo e cada um dos numerosos túbulos seminíferos apresenta espermatogônias na periferia e células germinativas em diferentes estágios em direção ao lúmen, no qual são depositados espermatozoides maduros. Os vasos deferentes também são divididos em três, mas a região distal é modificada em bulbo ejaculatório, muito muscular, no qual os espermatozoides são empacotados em espermatóforos e armazenados até a cópula.

Em Astacidea, o SRM de *Cherax quadricarinatus* foi estudado por López-Greco *et al.* (2007) e An *et al.* (2011). O SRM fica localizado no cefalotórax. Os testículos são formados por números lóbulos nas secções de cada lóbulo são encontradas células da linhagem germinativa em apenas um estágio de maturação (sincrônico) e o estágio de maturação encontrado em cada lóbulo é independente do encontrado nos lóbulos adjacentes. Eles observaram diferenças entre as células de Sertolli encontradas em lóbulos contendo espermatogônias e lóbulos contendo outras células da linhagem germinativa. Os vasos deferentes de *Cherax quadricarinatus* se conectam aos testículo em sua região mediana e apresentam um VDP enovelado que produz a primeira camada do espermatóforo, um VDM também enrolado que secreta a segunda camada do espermatóforo uma VDD com espessa camada muscular que armazena os espermatóforos maduros.

Erkan *et al.* (2009b) descreveu uma morfologia muito semelhante para os testículos de *Astacus leptodactylus*. Mas os vaso deferentes dessa espécie são enovelados em toda a sua extensão, ocorrente um aumento progressivo na espessura do vaso entre VDP, VDM e VDD. Todo o material dos espermatóforos de *Astacus leptodactylus* é secretado em todas as regiões, sendo observado um espessamento da parede entre VDP, VDM e VDD. Os espermatóforo foi descrito como sendo cilíndrico com um aspecto de "tubo interrompido".

Em *Nephrops norvegicus*, Rotllant *et al.* (2012) encontrou testículos lobulares pares que apresentam duas comissuras, formando uma estrutura de duplo H. Histologicamente não tem diferenciação entre os lóbulos encontradas nas diferente regiões desse duplo H. Cada lóbulo vai apresentar células germinativas em um ou dois estágios, células acessórias e um ducto coletor central onde são depositados os espermatozoides. Os vasos deferentes não são enovelados em nenhuma região, mas pode-se distinguir três regiões distintas de acordo com a espessura do vaso. O VDP é mais fino que o VDM e é subdividido em duas regiões, a primeira secreta uma substância amorfa que se junta aos espermatozoides e a segunda secreta a matriz que posteriormente se torna a parede do espermatóforo. O VDM é o mais espesso e forma um esfíncter em sua porção final, o qual é responsável pela separação do cordão de espermatóforo em espermatóforos únicos no momento da cópula. O VDD é o mais fino e serve apenas para transferir os espermatozoides para os gonópodes à medida que eles passam pelo esfíncter.

Em Brachyura, o Majoidae *Maja brachydactyla* apresenta testículos tubulares, nos quais há uma clara distinção entre três regiões do túbulo seminífero: uma zona germinativa na periferia em um lado do túbulo, contendo espermatogônias e células acessórias, uma zona de eva-

cuação no lado oposto contendo espermatozoides e entre elas, a zona de transformação, contendo espermatócitos e espermátides em diferentes estágios (SIMEÓ *et al.*, 2009). Os espermatozoides são transferidos para o VD, onde os espermatóforos são formados na porção mais proximal (chamada por ele de Vaso Deferente Anterior) e armazenados na porção mediana. A porção posterior tem função glandular. Os espermatóforos são esféricas a ovais de espermatozoides em uma matriz. Moyano *et al.* (2010) descrevem uma morfologia semelhante para outro membro da mesma família, *Libinia spinosa*.

Becker *et al.* (2013) estudou o SRM em três espécies de Pinnotheridae. Elas também apresentam vasos deferentes divididos em três porções. Na proximal os espermatóforos começam a ser secretados, são completados na porção mediana onde ficam armazenados. O VDD não contém espermatóforos e consistem em tubo curtos com vários apêndices secretores que produzem grandes quantidades de fluidos seminais.

Os testículos de *Eriphia verrucosa*, segundo Erkan *et al.* (2009a) consistem de tubos seminíferos bastante envelados, no quais existem uma zona germinativa em uma extremidade e um ducto coletor na outra. Espermátides maduras são depositadas no ducto coletor e completam a espermiogênese em seu interior.

O Portunidae *Portunus pelagicus* foi estudado por Ravi *et al.* (2014) e Stewart *et al.* (2010). O primeiro fez uma descrição do SRM completo e o último focou na espermatogênese. Outro Portunidae, *Callinectes danae* foi estudado por Zara *et al.* (2012). Os três estudos mostram uma morfologia semelhantes para essas espécies. Os testículos são lobulares e apresentam uma clara distinção entre uma zona germinativa, zona de transformação e ducto coletor. Não são encontradas diferenças entre regiões anterior e posterior dos testículos. O VDP é subdividido em uma porção proximal e uma distal baseada na morfologia das células epiteliais e na atividade secretora. O VDM secreta a matriz espermatofórica na qual os espermatóforos ficam embebidos e o VDD secreta materiais seminais, mas não apresenta espermatóforos.

Segundo Shinozaki-Mendes *et al.* (2012) *Cardisoma guanhumii* (Gecarcinidae) apresenta testículos lobulares com uma comissura em sua porção posterior. Cada lóbulo apresenta uma zona germinativa bem evidente, contendo apenas espermatogônias, uma zona de transformação e um ducto coletor. O ducto coletor se conecta com o vaso deferente. A região mais proximal do VD secreta a parede do espermatóforo e a mediana secreta a matriz espermatofórica e armazena os espermatóforos. A região posterior é formada por vários túbulos que secretam uma matriz glicoproteica a ser ejaculada juntos com a massa espermatofórica. Os espermatóforos são

ovoides e de tamanhos variados.

Uma morfologia semelhante do SRM, incluindo um VDP formado por vários túbulos secretores também foi observado por Nicolau *et al.* (2012) para o Grapsidae *Aratus pisonii*.

Os espermátóforos de crustáceos são amplamente utilizados na filogênia do grupo (TUDGE, 1991). Especialmente em Paguroideos onde eles apresentam a maior complexidade estrutural e maior diversidade de formas (TUDGE, 1991; SUBRAMONIAM, 1993). De acordo com Tudge (1991) e Subramoniam (1993) o espermátóforo típico de Paguroidea é tripartido e consiste em uma ampola, um pedúnculo e um pedestal.

Em *Pagurus exilis*, os vasos deferentes são divididos em apenas duas regiões, um proximal curta e enovelada e uma distal longa e reta (SCELZO *et al.*, 2010). Os espermátóforos maduros foram encontrados aleatoriamente em toda a extensão do vaso deferente. Os espermátóforos são tripartidos, com uma ampola principal alongada, pequenas ampolas acessórias laterais, um pedúnculo curto e um pedestal.

Tirelli *et al.* (2007) e Tirelli *et al.* (2010) observaram uma sequencia na formação dos espermátóforos semelhantes para *Clibanarius erythropus* e *Paguristes eremita* respectivamente. Nessas espécies a parede dos espermátóforos começa a ser formada no VDP. Entre o VDP e o VDM o espermátóforo é separado em pacotes, formando as ampolas. Ao longo do VDM, o pedúnculo e o pedestal são formados e o espermátóforo completo é armazenado no VDD. O espermátóforo de *C. erythropus* apresenta uma ampola esférica com uma invaginação na base, na qual o pedúnculo fino e alto é inserido e pedestal. Já o de *P. eremita* apresenta uma ampola cilíndrica com um pedúnculo curto e grosso e um pedestal.

Em *Calcinus tibicen*, os espermátóforos já estão separados formando ampolas esféricas e ligadas por pedestais no VDP. No VDM, o pedúnculo e o pedestal irão se desenvolver e os espermátóforos continuam ligado pelos pedestais. O espermátóforo maduro apresenta pedúnculos longos e finos, ampolas esféricas e pedestais bem desenvolvidos formando a ligação entre os espermátóforos (AMADIO; MANTELATTO, 2009).

Buranelli e Mantelatto (2012) reportam que os espermátóforos tripartidos de *Petrochirus diogenes* já estão formados (*i.e.* apresentam sua três estruturas básicas, ampola, pedúnculo e pedestal) no VDP e apenas ocorre um alongamento do pedúnculo durante a passagem pelo VDM. O espermátóforo maduro encontrado no VDD apresenta um pedúnculo longo e fino com uma ampola achatada dorso-ventralmente e um pedestal que liga os espermátóforos formando um cordão.

Uma e Subramoniam (1984) encontraram um espermatóforo diferente do padrão básico de Diogenidae para *C. longitarsus*. O espermatóforo não apresenta pedúnculo nem pedestal. Os espermatóforos consistem apenas em um cordão de ampolas contendo espermatozoides ligadas umas às outras através de um cordão gelatinoso. A parede do espermatóforo é secretada no VDP e o espermatóforo é dividido em ampolas na transição entre o VDP e o VDM. O cordão gelatinoso é secretado pelo VDM e ligado às ampolas na região da invaginação central na base destas.

Hess e Bauer (2002) registraram um espermatóforo sem pedúnculo e pedestal para *C. vitattus* ao estudarem a forma de cópula dessa espécie. Os espermatóforos consistem em cordões de ampolas ligadas umas às outras por projeções laterais.

Um espermatóforo apedunculado também foi descrito para *Clibanarius sclopetarius* por Santos e Mantelatto (2011). Os espermatóforos são formados por ampolas achatadas ventro-dorsalmente e projeções laterais das ampolas que conectam essas umas às outras formando um cordão de ampolas.

3 METODOLOGIA

3.1 Coleta dos animais

Indivíduos de *Clibanarius sclopetarius* e *C. symmetricus* foram coletados a mão no estuário do Rio Jaguaribe (4°28'34"S 37°46'38"W) próximo ao município de Aracati - CE durante o período de Novembro de 2014 a Novembro de 2016. Os animais foram coletados como parte de um projeto maior que busca analisar toda a biologia reprodutiva e populacional desses animais.

3.2 Laboratório

Em laboratório, os animais foram colocados em congelador durante 15 minutos, tempo suficiente para anestesiá-los, mas não para congelar os tecidos. Foram retirados das conchas de gastrópodes em que se encontravam e foram dissecados para retirada do sistema reprodutor masculino.

Os órgãos dissecados foram analisados macroscopicamente e fotografados e então fixados em solução de Davidson durante 24 horas. Após fixação, o material foi desidratado em série de concentração crescente de etanol (70-100%), clarificado em Xilol e impregnado e incluído em parafina. Foram feitas secções de 5 μm com o auxílio de um micrótomo.

As lâminas foram coradas pelo métodos Hematoxilina-Eosina (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983), Tricrômico de Gomori (BEHMER; TOLOSA, 2003) para diferenciação de tecidos e detecção de fibras colágenas, Azul de Alcian/PAS (JUNQUEIRA; JUNQUEIRA, 1983) para detecção de polissacarídeos ácidos e glicoproteínas e Azul de Bromofenol (PEARSE, 1953) para detecção de proteínas gerais. As observações foram feitas em um microscópio Leica DM 10000 com câmera acoplada.

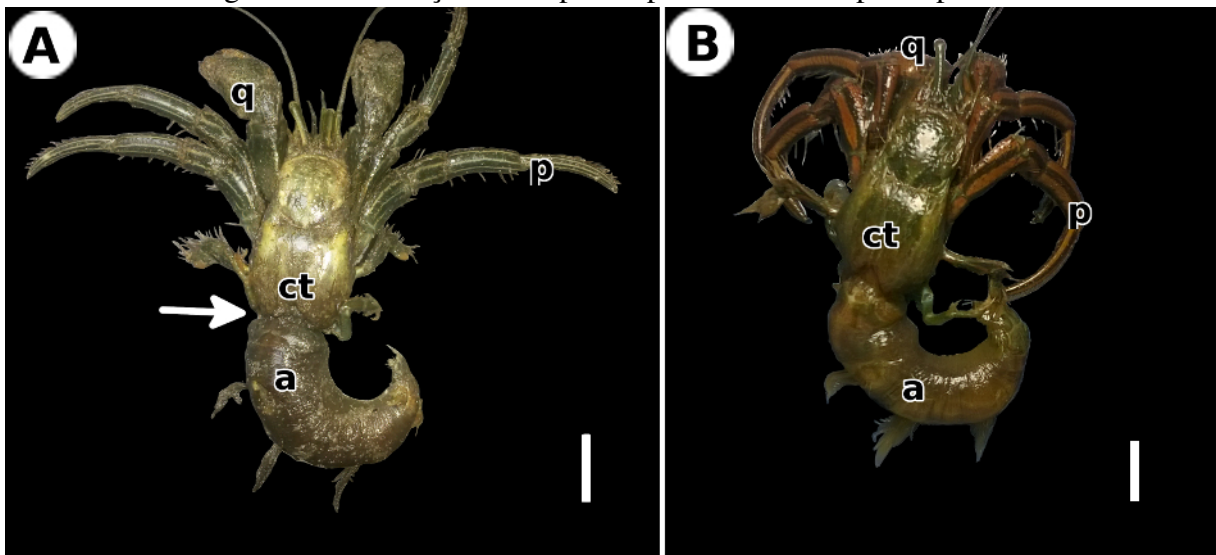
As observações da morfologia dos espermátóforos foram feitas a partir espermátóforos de animais que haviam espontaneamente ejaculado sua massas espermatóforicas, que puderam ser observadas próximas aos gonóporos desses animais. Os espermátóforos foram corados com Rosa Bengala e analisados imediatamente.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação das Espécies

Indivíduos de *Clibanarius sclopetarius* e *C. symmetricus* apresentam um abdome assimétrico, não calcificado e que não se encontra fusionado com o último segmento torácico, havendo uma separação marcante entre o cefalotórax e o abdome, pela formação de uma "cintura" característica de membros da família Diogenidae. Machos de ambas as espécies apresentam pleópodos ímpares, estando presentes em apenas um lado do abdome. Nenhuma das duas espécies apresenta diferenças significativas entre os quelípodos direito e esquerdo. A diferenciação entre as duas espécies pode ser feita a partir do padrão de faixas presentes nos pereiópodes. *C. sclopetarius* apresenta um padrão de quatro faixas escuras alternando com 4 faixas claras, enquanto *C. symmetricus* apresentar 8 faixas escuras separadas por 8 faixas claras mais finas (Figura 1).

Figura 1 – Vista dorsal de indivíduos. A. *Clibanarius symmetricus* B. *C. sclopetarius*. Abdome torcido e não calcificado, não fusionado ao último segmento torácico, formando uma cintura (seta) entre abdome e cefalotórax, com pleópodos ímpares. Quelípodes semi-iguais. Identificação das espécies pelas faixas nos pereiópodes.



a. abome. ct. cefalotórax. p. pereiópode. q. quelípode. Barra de escala: 1 cm

Fonte: O autor.

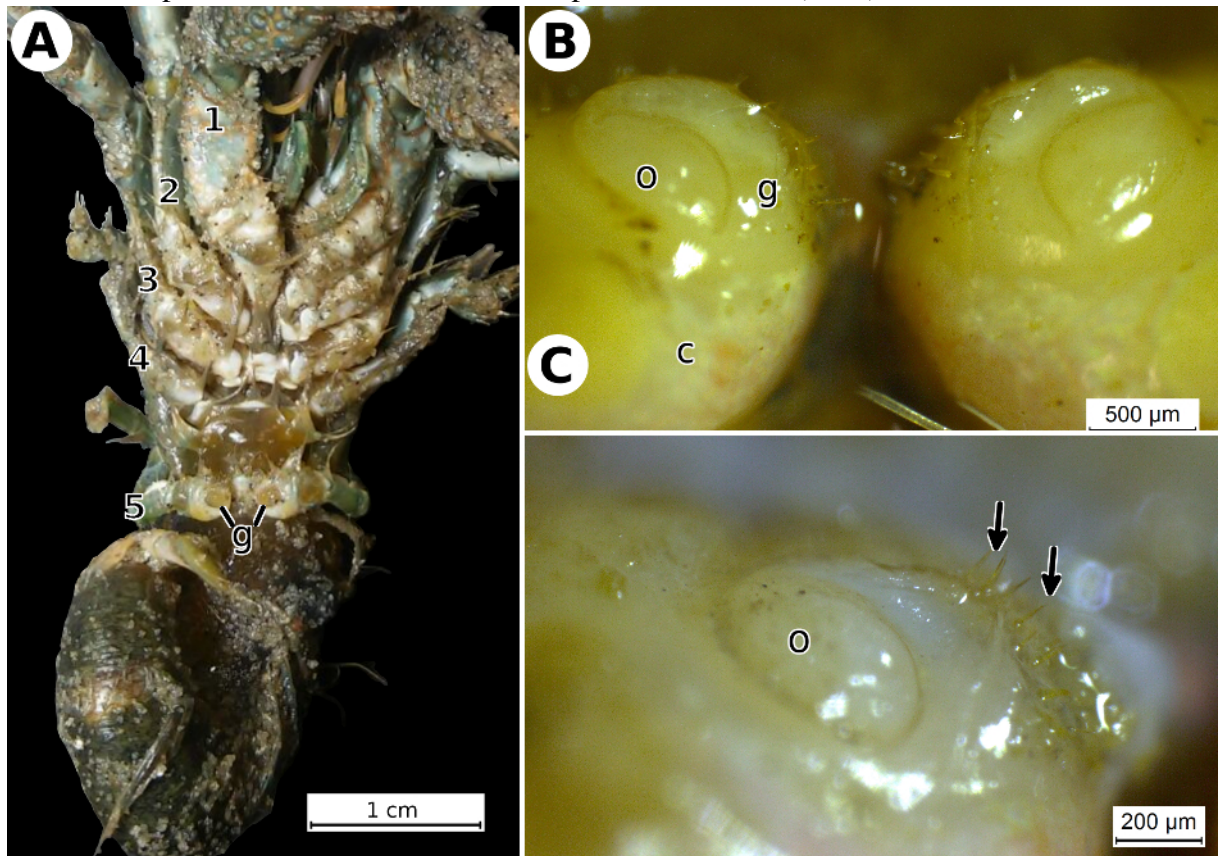
4.2 Descrição do Sistema Reprodutor Masculino

Os sistemas reprodutores masculinos de *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* são bastante semelhantes. As descrições e ilustrações apresentadas são válidas para ambas as espécies.

4.2.1 Aspectos Macroscópicos

O Sistema Reprodutor Masculino de ambas as espécies consiste em um par de testículos e um par de vasos deferentes localizados em sua maior parte no abdome, mas que se conectam com o exterior pelos gonóporos localizados nas coxas do quinto par de pereiópodes (Figura 2). Os gonóporos são aberturas circulares cobertas por um opérculo membranoso circundados parcialmente por cerdas curtas (Figura 2). Nenhum apêndice ou estrutura especializada para a transferência de esperma foi observada.

Figura 2 – Vista ventral de indivíduos. A. Gonóporo masculino localizado nas coxas do quinto par de pereiópodes (pereiópodes números do 1º ao 5º par). B. Detalhe dos gonóporos apresentando um opérculo membranoso. C. Detalhe de um único gonóporo com opérculo membranoso e rodeado por cerdas curtas (setas).



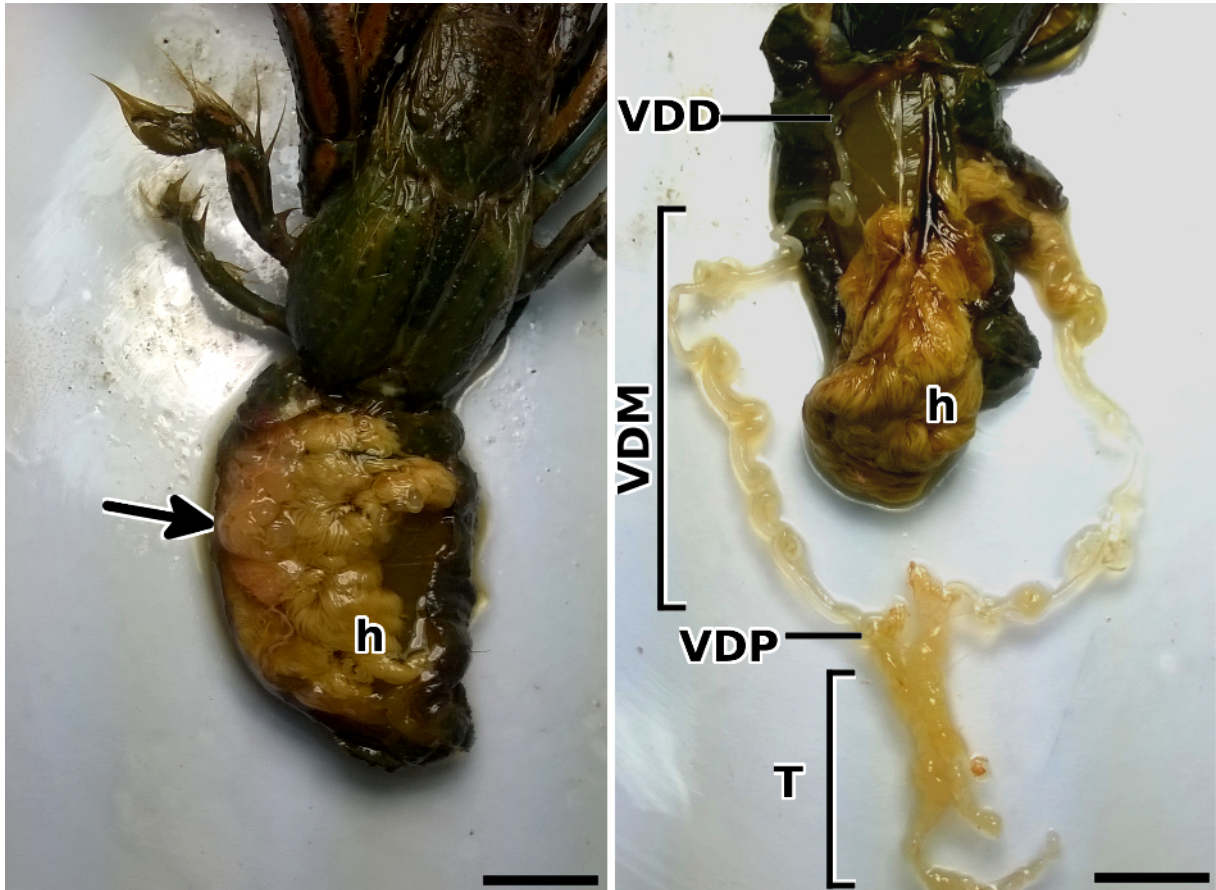
g. gonóporo. o. opérculo. c. coxa.

Fonte: O autor.

Os testículos, parte mais posterior do sistema reprodutor masculino, fica localizado aproximadamente na metade do abdome, dorsalmente ao hepatopâncreas (Figura 3). São lobulares e apresentam uma coloração que variou de transparente esbranquiçada a amarelada. Os testículos são mantidos juntos por uma membrana, mas não existe nenhuma conexão ou comissura interligando os testículos direito e esquerdo. Cada testículo continua diretamente para

cada vaso deferente, sem haver conexões entre os componentes direito e esquerdo do sistema reprodutor em toda a sua extensão (Figura 3).

Figura 3 – Fotos da dissecação dos indivíduos. A. Posicionamento do sistema reprodutor masculino no abdome, dorsalmente ao hepatopâncreas (h). B. Após retirada do sistema reprodutor, possibilitando a visualização dos testículos lobulares e um vaso deferente com três regiões, um vaso deferente proximal (VDP) curto, vaso deferente mediano (VDM) longo e enovelado e um vaso deferente distal (VDD) reto.



Barra de escala: 1 cm

Fonte: O autor.

Baseado em seu aspecto macroscópico, o vaso deferente é dividido em três regiões: o vaso deferente proximal (VDP), o vaso deferente mediano (VDM) e o vaso deferente distal (VDD) (Figura 3). O VDP é o mais próximo do testículo, diretamente conectado com este e se apresenta como um tubo fino e altamente enovelado, muitas vezes de difícil observação e dissecação. A medida que ele continua para o VDM, o vaso fica mais espesso e altamente enovelado, com coloração esbranquiçada mais evidente. Na região mais distal, VDD, ele fica ainda mais espesso mas perde o seu aspecto enovelado, sendo um tubo relativamente reto e mais curto se comparado com o VDM. Todo o sistema reprodutor masculino de *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* está localizado no abdome desses animais com exceção da porção final do VDD

que se estende para o gonópodos no cefalotórax.

4.2.2 Aspectos Microscópicos

4.2.2.1 Testículo

. Os testículos são revestidos por uma membrana fibrosa que agrupa todos os lóbulos (Figura 4C).

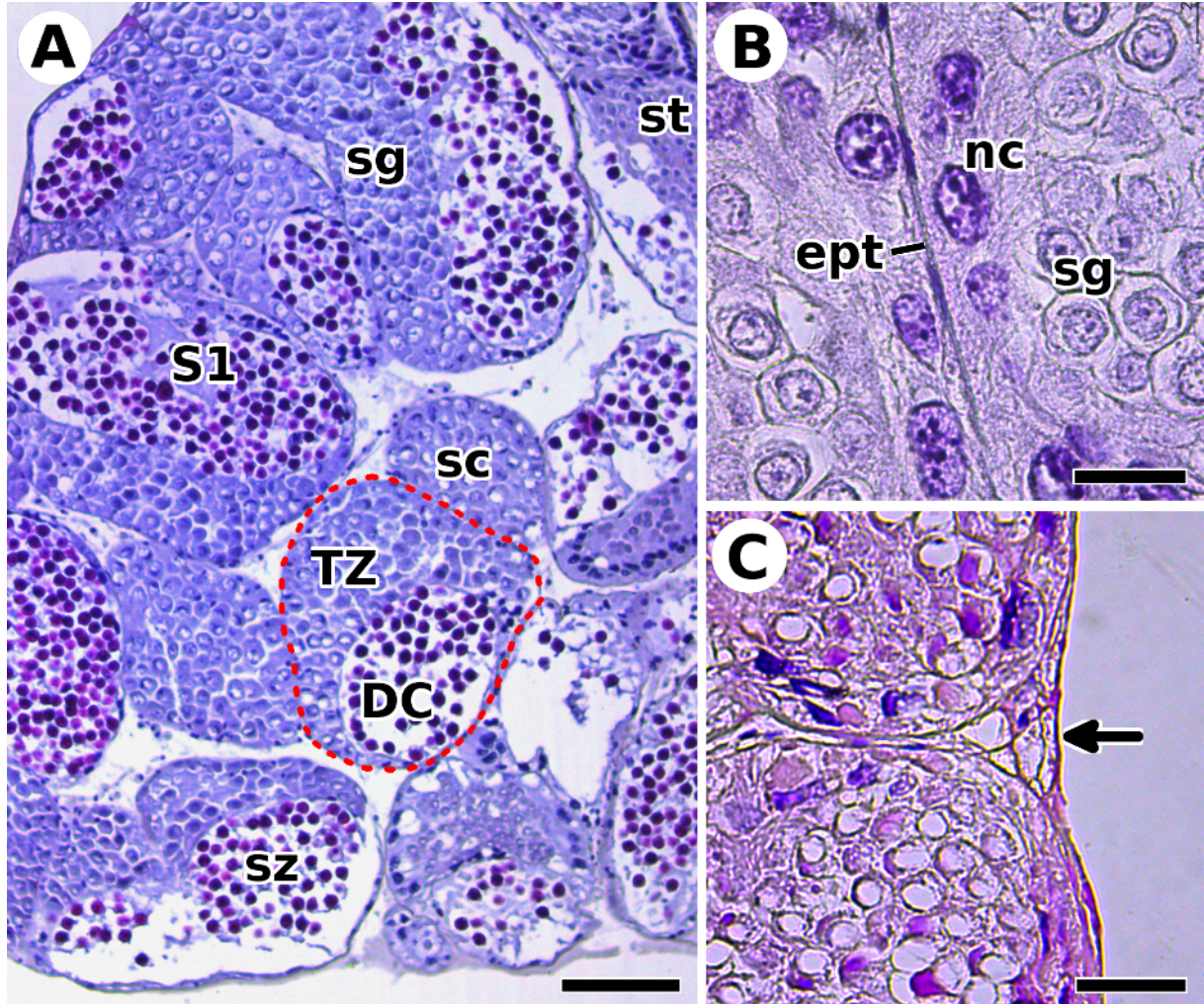
O revestimento de cada lóbulo é formado por um fino epitélio simples pavimentoso, com células achatadas (Figura 4B). Células acessórias são encontradas em proximidade com o epitélio simples dos lóbulos internamente a esse (Figura 4B). As células acessórias apresentam um núcleo grande basófilo de aspecto granular e formas irregulares, variando de esféricas a ovóides. O citoplasma é de difícil distinção.

No interior de cada túbulo pode-se observar uma zona de transformação (ZT) onde estão presentes células germinativas em diferentes estágios e um ducto coletor (DC) com lúmen irregular onde são depositados os espermatozoides para serem transferidos para o vaso deferente (Figura 4A). Apenas espermatozoides foram encontrados no DC. Uma secreção basófila rica em polissacarídeos chamada aqui de Secreção 1 (S1) (Tabela 1) é adicionada ao DC englobando os espermatozoides (Figura 4).

Em uma mesma secção do testículo é possível observar células germinativas em estágios diferentes em diferentes lóbulos, mas em cada lóbulo estão presentes apenas um ou dois estágios da linhagem germinativa (Figura 4A). Espermatogônias e outras células germinativas estavam presentes em secções de toda a extensão dos testículos, não havendo uma diferenciação entre regiões posterior e anterior.

Foram descritos quatro tipos de células da linhagem germinativa (Figura 5). Espermatogônias (Figura 5A) são células com núcleo granular grande e com o citoplasma reduzido em relação ao tamanho núcleo, geralmente aparecendo com uma faixa fina ao redor desse. Espermatócitos (Figura 5B) apresentam cromatina mais dispersa no núcleo em relação à espermatogônia, mas também apresentam um núcleo grande em relação ao citoplasma reduzido. Espermatídes foram observadas em dois estágios. A espermatíde inicial (Figura 5C) apresenta uma fase granular. Seu núcleo é bem visível e são observados alguns pontos de condensação da cromatina. A espermatíde final (Figura 5D) apresenta uma concentração de material em dos polos da célula, iniciando o processo de formação da vesícula acrossomal dos espermatozoides.

Figura 4 – Fotomicrografias do Sistema Reprodutor Masculino. Testículo. A. Visão geral do testículo com vários lóbulos formados por uma zona de transformação (ZT) com células germinativas e um ducto coletor (DC) com espermatozoides e S1. B. Detalhe da periferia dos lóbulos, com um epitélio simples escamoso e células acessórias próximas a ele. C. Testículo revestido por uma membrana fibrosa (seta).

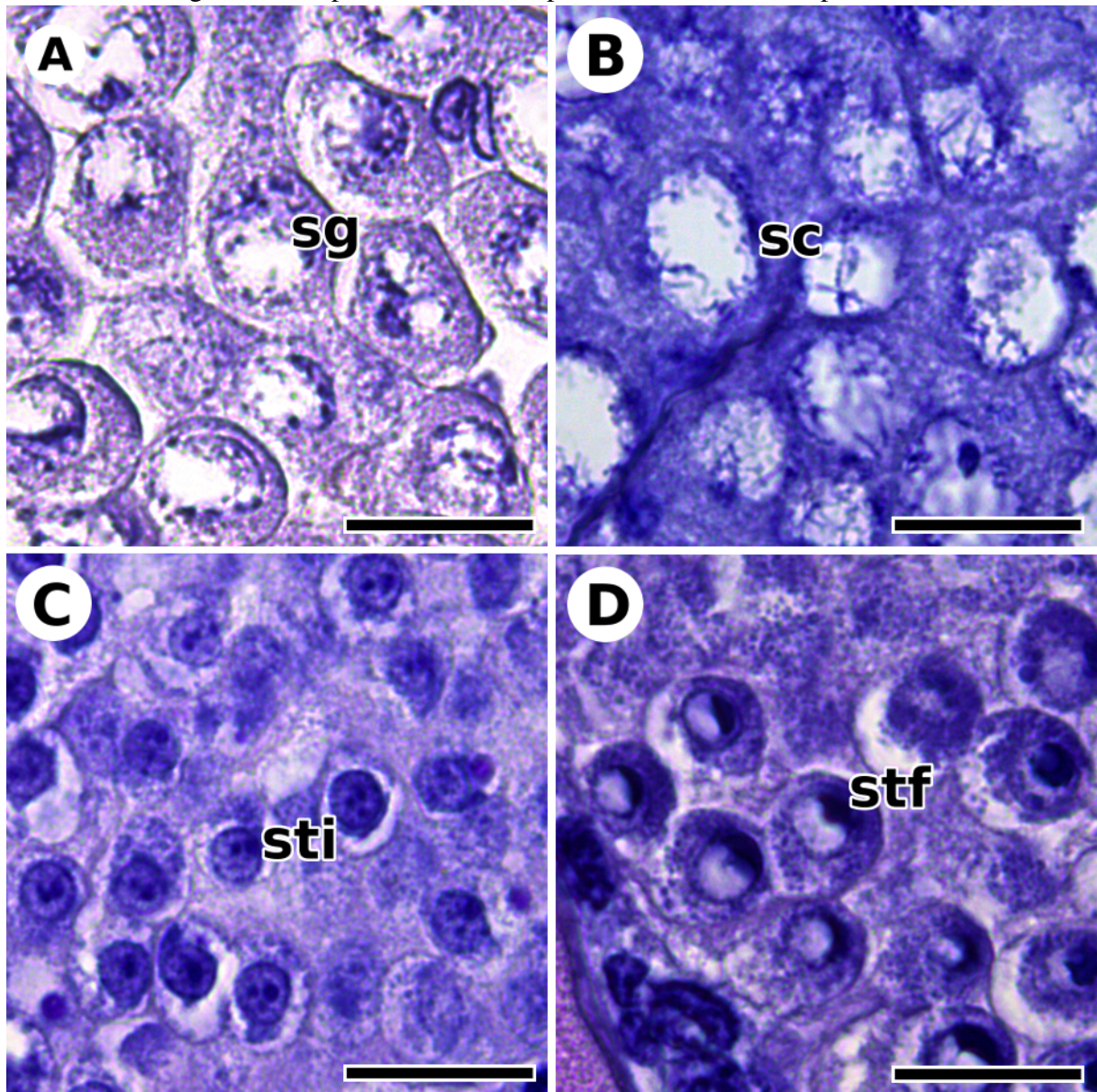


ept. Epitélio. nc. Célula Acessória. sc. Espermatócito. sg. Espermatogônia. st. Espermatíde. sz. Espermatozoide. A e C, Hemtoxilina-Eosina. B, Tricrômico de Gomori. Barra de escala: A. 100 μm . B. 20 μm . C. 20 μm

Fonte: O autor.

Os espermatozoides de ambas as espécies apresentam uma vesícula acrossomal esférica eosinófila grande. Citoplasma e núcleo são dificilmente observáveis. Na vesícula acrossomal é possível distinguir pelas diferenças na reação aos corantes, um *perforatorium* e ao redor dele um anel do *perfortarium* que se coram mais intensamente com a eosina em relação ao resto da vesícula. Na extremidade oposta ao *perforatorium*, observa-se um opérculo basófilo. A estrutura dos espermatozoides de ambas as espécies são muito semelhantes a microscopia de luz. A única diferença está no tamanho da vesícula acrossomal com *C. sclopetarius* apresentando uma vesícula um pouco menor que a de *C. symmetricus* (Figura 6).

Figura 5 – Fotomicrografias do Sistema Reprodutor Masculino. Células germinativas. A, Espermatogônia. B, Espermatócito. C, Espermatíde inicial. D, Espermatíde final.



sg. espermatogônia. sc. espermatócito. sti. espermatíde inicial. stf. espermatíde final. Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 20 μ m

Fonte: O autor.

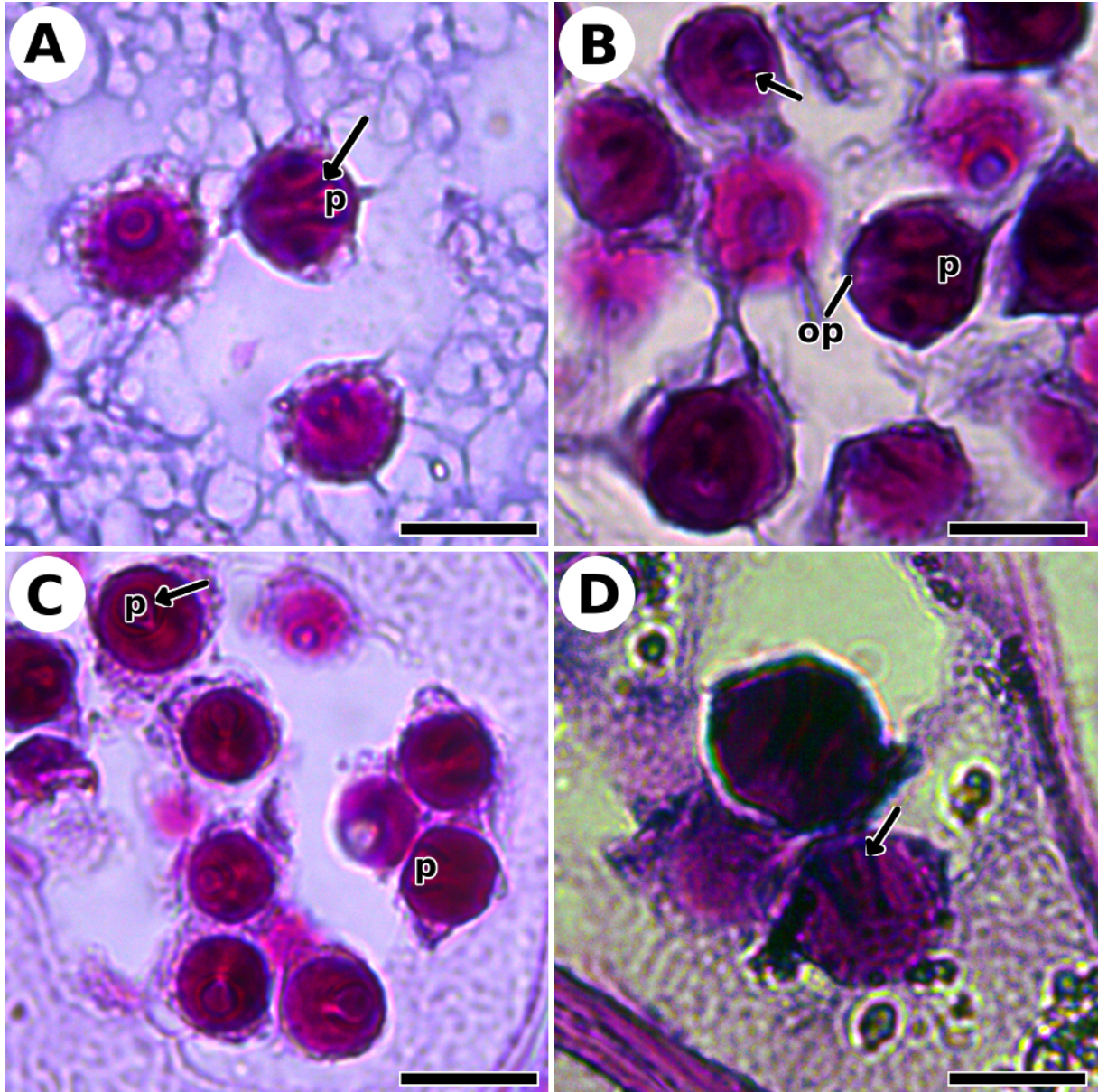
4.2.2.2 Vaso deferente e formação do espermatóforo

4.2.2.2.1 Vaso Deferente Proximal(VDP)

O revestimento do VDP é formado por uma camada interna espessa de epitélio colunar secretor, com células altas e uma fina camada de tecido conjuntivo (Figura 7).

Em secções transversais é possível notar uma diferença na espessura do epitélio, formado por diferença na altura de suas células em dois lados opostos do vaso(Figura 7).

Figura 6 – Fotomicrografias do Sistema Reprodutor Masculino. Espermatozoides A e C, *Clibanarius sclopetarius*. B e D, *Clibanarius symmetricus*. A e B, Testículo. C e D, Vaso Deferente Distal. Espermatozoides formados por uma vesícula acrossomal esférica contendo um *perforatorium* e ao redor deste, um anel do *perforatorium* (setas). No ápice, um opérculo basófilo.



p. *perforatorium*. op. opérculo. A e C, Hematoxilina-Eosina. B e D, Tricrômico de Gomori. Barra de escala: 20 μ m
Fonte: O autor.

Microscopicamente, o VDP pode ser subdivido ainda em duas regiões uma região inicial(Figura 7A), mais próxima dos testículos e uma final(Figura 7B), mais distante do testículo.

O VDP inicial (VDPi) é menos espesso e seu epitélio secreta uma substância acidófila de natureza proteica e fibrosa, a Parede do Espermatóforo (SW) (Tabela 1) que envolve os espermatozoides e a S1 previamente produzidas no testículo(Figura 7A).

No VDP final (VDPf), o espermatóforo, que neste momento é um tubo simples e

contínuo formado pela SW, circundando os espermatozoides e a S1, é mantido próximo ao lado menos espesso da parede do vaso enquanto é separado do outro lado a medida que o lumen cresce e é preenchido por com uma nova secreção, Secreção 3 (S3), rica em mucopolissacarídeos produzida pelo epitélio do VDP final(Figura 7B, Tabela 1).

4.2.2.2.2 Vaso Deferente Mediano (VDM)

Microscopicamente o VDM se difere do VDP por apresentar um revestimento formado por uma cama epitelial interna e uma camada muscular externa(Figura 8). O VDM é um tubo enovelado e secções longitudinais permitem a diferenciação do revestimento do tubo entre o lado côncavo e convexo de cada volta(Figura 8). O lado convexo apresenta um epitélio achatado com aspecto pavimentoso e que secreta uma um componen basófilo em baixas quantidades que se misturam à S3, e sua camada muscular tem espessura mais fina se compara com o lado côncavo(Figura 8D). No lado côncavo, o epitélio tem aspécto cúbico, com células de núcleo esférico e secretoras de uma nova secreção acidófila, Secreção 4 (S4) (Tabela 1)de natureza glicoprotéica que fica associada aos espermatóforos(Figura 8A, B e C).

No VDM, o espermatóforo já pode ser observado como pacotes isolados, contendo os espermtazóides e S1, diferente do aspecto tubular observado no VDP(Figura 8).

O lúmen do VDM é completamente preenchido com espermatóforos, S3 e S4 próximo aos espermatóforos no lado côncavo do tubo.

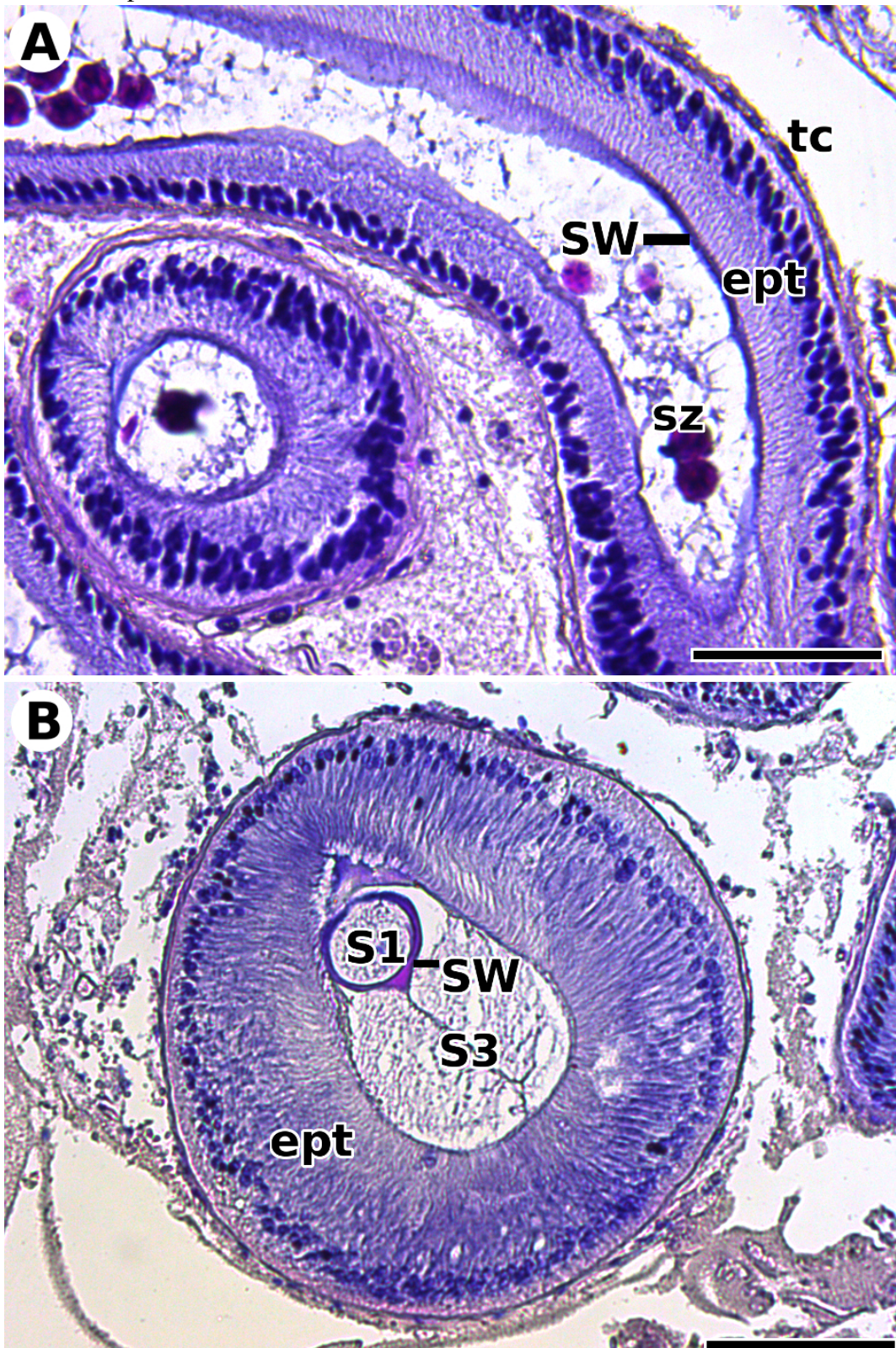
4.2.2.2.3 Vaso Deferente Distal (VDD)

O revestimento do VDM (Figura 9) é formado por uma camada fibrosa mais externa, uma espessa camada de tecido muscular e um epitélio cúbico mais interno. O VDD é um tubo reto e não há distinção no revestimento entre lados distintos do tubo. O epitélio cúbico do VDD secreta uma nova Secreção 5 (S5) de rica em polissacarídeos e que se difere da S3 pela sua reação com Azul de Bromofenol, indicando a presença de proteínas (Tabela 1).

O lúmen do VDD é preenchido com os espermatóforos já formados as demais secreções formadas no nas outras regiões do sistema reprodutor e a S5 que se junta às demais secreções seminais.

Um resumo com todas as reações apresentadas pelas secreções descritas aqui é apresentado na Tabela 1 a seguir.

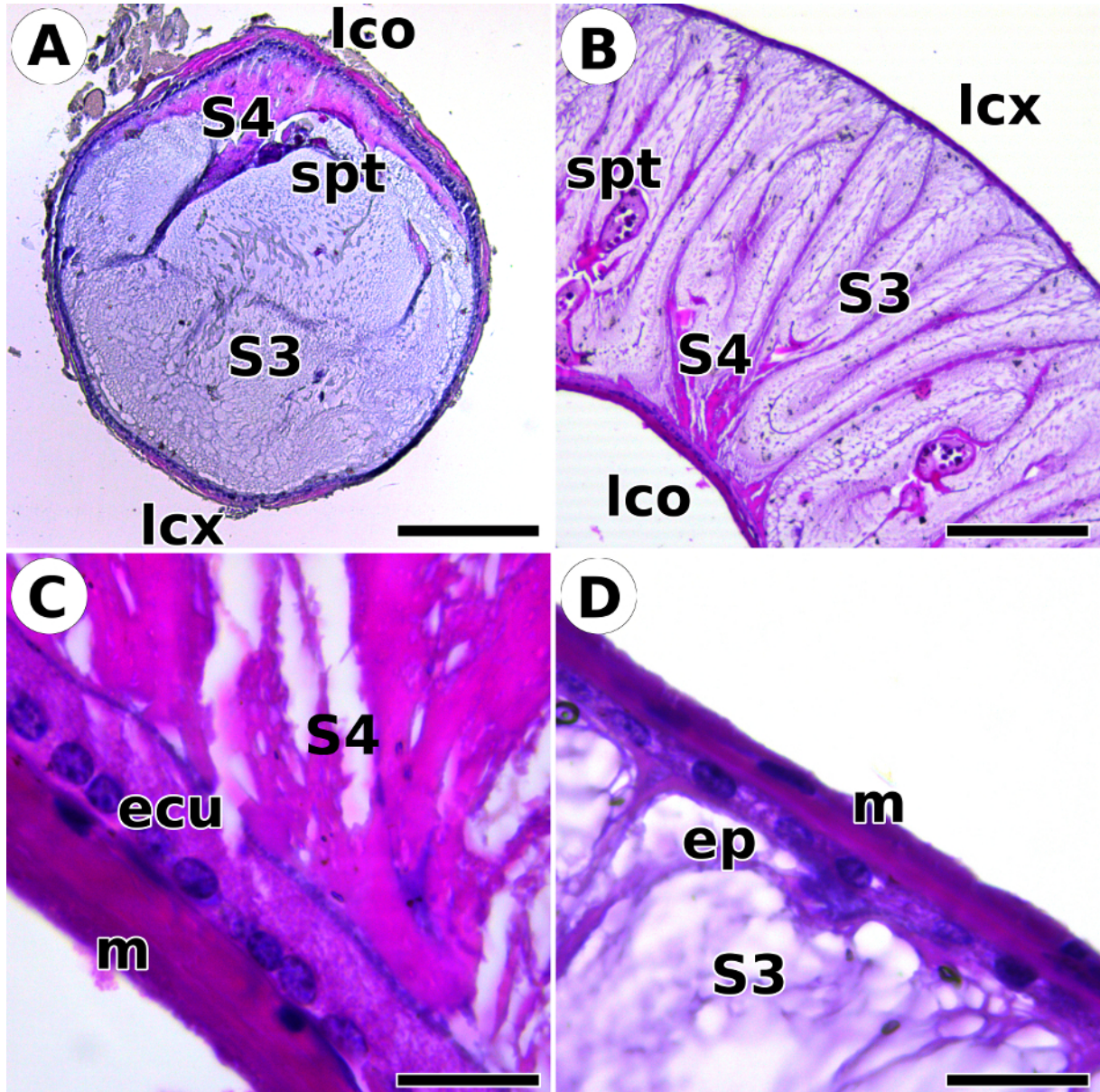
Figura 7 – Fotomicrografias do Sistema Reprodutor Masculino. Vaso deferente proximal. A, VDP inicial. B, VDP final.



ept. Epitélio. tc. Tecido conjuntivo. sz. Espermatozoide. Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: A. 50 μ m. B. 100 μ m.

Fonte: O autor.

Figura 8 – Fotomicrografias do Sistema Reprodutor Masculino. Vaso Deferente Mediano. A, seção transversão mostrando o acúmulo de S4 e dos espermatóforos em um lado do vaso. B, secção longitudinal evidenciando as diferenças entre os lado côncavo e convexo do vaso. C e D, detalhes de B.



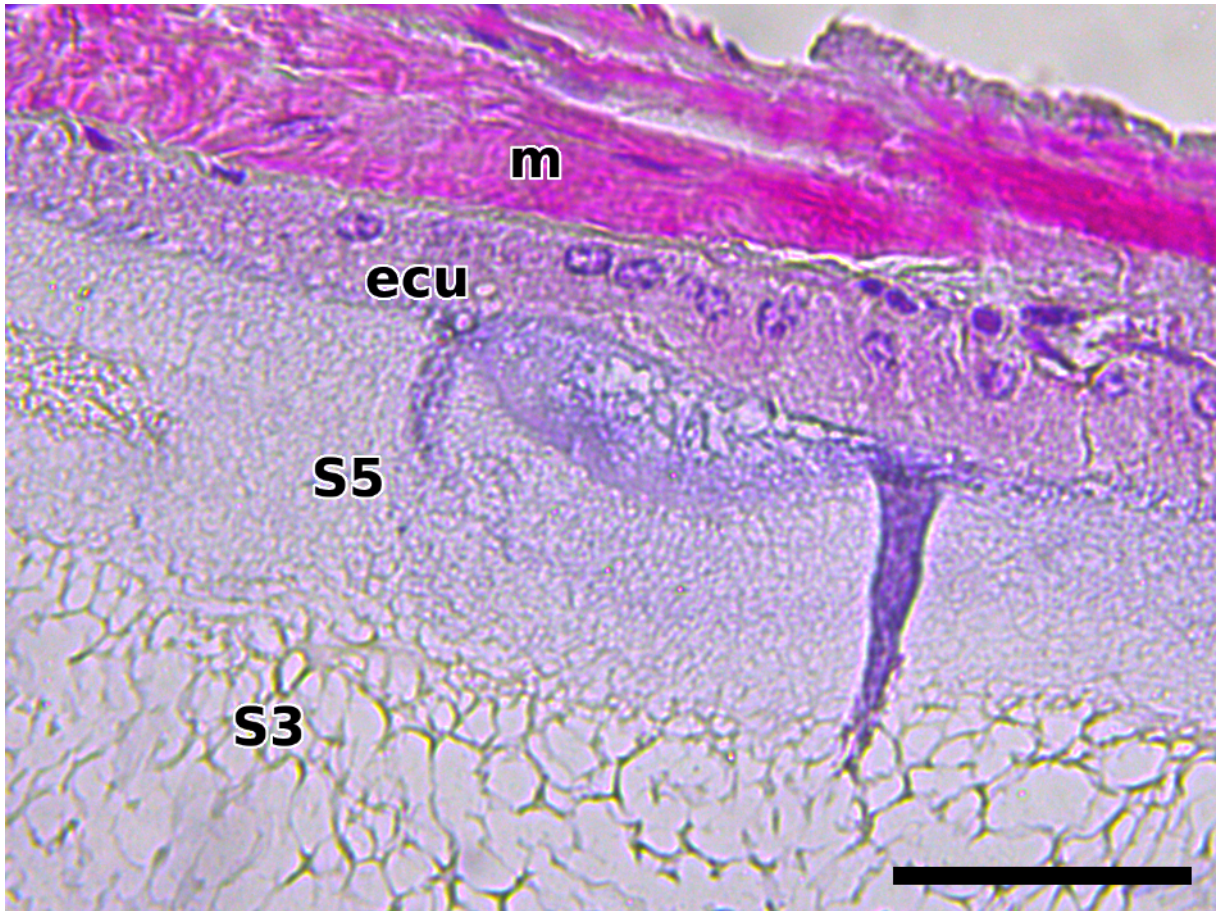
ecu. Epitélio cúbico. ep. Epitélio pavimentoso. lco. Lado Côncavo. lcx. Lado convexo. m. Camada muscular. spt. Espermatóforo. Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: A. 200 μm . B. 100 μm . C e D. 20 μm

Fonte: O autor.

4.2.3 Morfologia do Espermatóforo

Em ambas as espécies, os espermatóforos consistem em uma corrente de ampolas contendo os espermatozóides e S1 e membranas laterais que ligam as ampolas entre elas. Haste e pedestal não estão presentes no espermatóforos de *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* (Figura 10). Na base de cada ampola, existe uma invaginação central.

Figura 9 – Fotomicrografias do Sistema Reprodutor Masculino. Vaso Deferente Distal. Camada interna formada por um epitélio cúbico secretor da S5 e camada externa muscular espessa.



ecu. epitélio cúbico. m. camada muscular. Hematoxilina-Eosina. Barra de escala: 50 µm

Fonte: O autor.

Tabela 1 – Origem e reação das secreções do sistema reprodutor masculino aos reagentes utilizados.

	S1	SW	S3	S4	S5
Origem	Testículo	VDPi	VDPf	VDM	VDD
H-E	+	++	+	++	+
	Roxo	Vermelho	Roxo	Vermelho	Roxo
Azul de Alcian/PAS	++	++	++	++	++
	Azul	Magenta	Azul	Magenta	Azul
Azul de Bromofenol	-	++	-	++	+
Tricrômico de Gomori	+	++	+	++	+
	Roxo	Vermelho/Verde	Roxo	Vermelho	Roxo

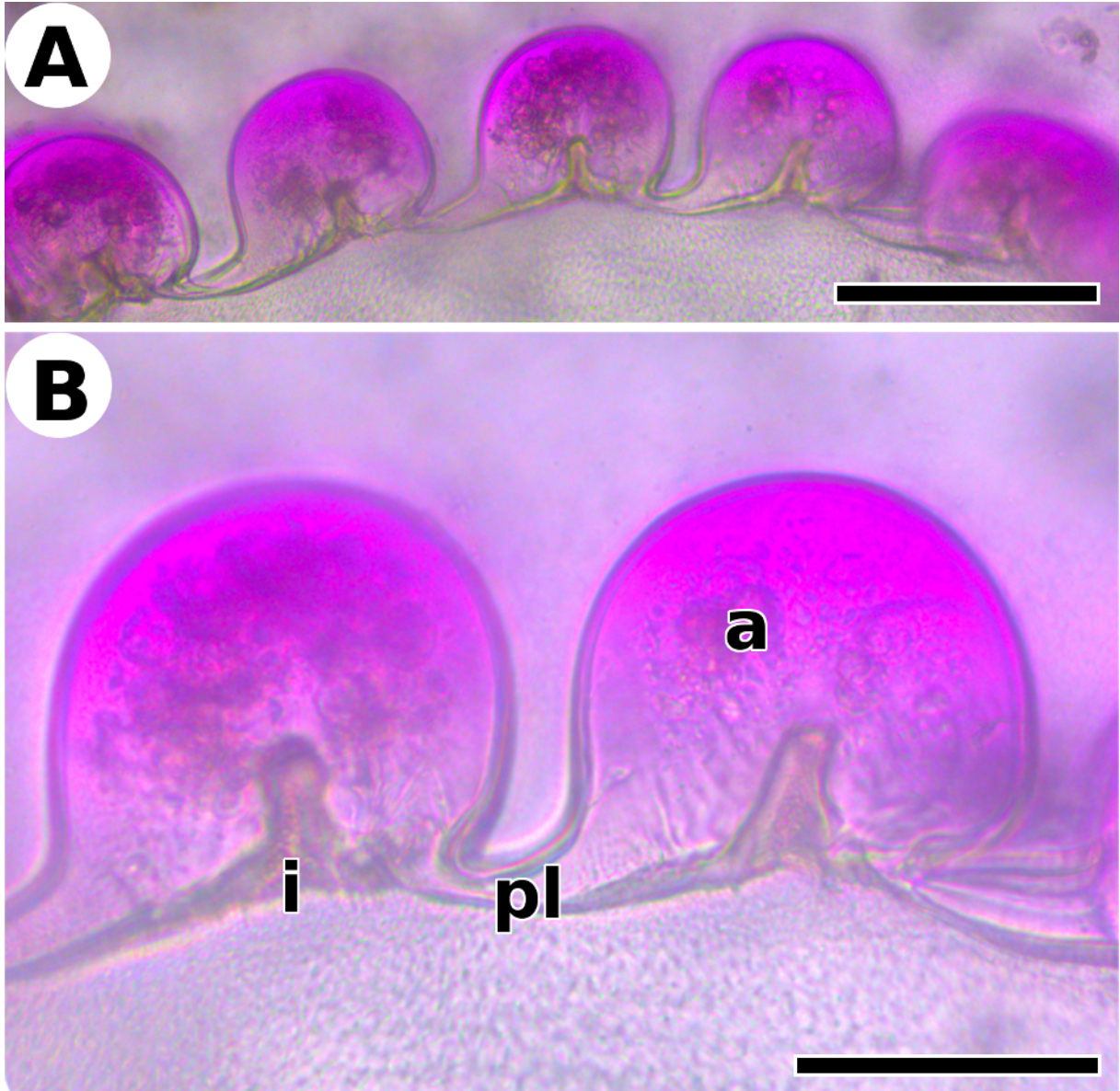
S1. Secreção 1. SW. parede do espermátóforo. S3. secreção 3. S4. secreção 4. S5. secreção 5. VDD. vaso deferente distal. VDM. vaso deferente mediano. VDPi. vaso deferente proximal inicial. VDPf. vaso deferente proximal final.

Fonte: O autor

Não foram encontradas diferenças significativas na morfologia entre os espermátóforos de *C. scolopetarius* e *C. symmetricus*. O espermátóforo de *C. scolopetarius* aparenta conter

mais espermatozoides que os de *C. symmetricus* mas a contagem precisa das células não foi realizada.

Figura 10 – Espermátóforo de *Clibanarius symmetricus* A. Espermátóforos unidos lateralmente formam um cordão de espermátóforos. B. Detalhe do espermátóforo, formado por uma ampola com projeções laterais e uma invaginação basal.



a. ampola. pl. projeção lateral. i. invaginação. Corante: Rosa Bengala. Barra de escala: A. 200 *mum*. B. 100 *mum*
Fonte: O autor.

5 DISCUSSÃO

5.1 Aspectos Macroscópicos

Os gonóporos masculinos de *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* apresentam um opérculo membranoso de acordo com o observado por outros autores para as mesmas espécies (SANT'ANNA *et al.*, 2010; SANTOS; MANTELATTO, 2011) e semelhante ao encontrado em outros membros da família Diogenidae como *Calcinus tibicen* (AMADIO; MANTELATTO, 2009), *Clibanarius erythropus* (TIRELLI *et al.*, 2007), *Clibanarius vitattus* (HESS; BAUER, 2002) *Dardanus insignis* (BURANELLI *et al.*, 2014), *Paguristes eremita* (TIRELLI *et al.*, 2010), *Petrochirus diogenes* (BURANELLI; MANTELATTO, 2012) e de outras famílias de caranguejos-ermitões *Pagurus exilis* (SCELZO *et al.*, 2010) embora alguns desses autores tenham usado nomenclaturas diferentes ("cobertura do gonóporo", "membrana tipo aba" e "aba cuticular", do inglês "gonopore cover", "flap-like membran" e "cuticular flap").

A função desse opérculo pode estar associado a proteção contra dessecação em espécies que vivem na zona entremarés, durante o período de maré baixa em que esses animais ficam expostos. É provável que a abertura do opérculo ocorra por meio de força mecânica à medida que os espermátóforos vão sendo expelidos no momento da cópula como proposto por Tirelli *et al.* (2007). Entretanto os mesmos autores ressaltam que a possibilidade de outras formas de abertura como quebra mecânica, atividade muscular e dissolução química não devem ser descartadas.

Nenhum tipo de prolongação dos ductos ejaculatórios ou gonóporos como os tubos sexuais observado em outras espécies de caranguejos-ermitões (TUDGE; LEMAITRE, 2004) ou papilas genitais ou penis observados em outros crustáceos (RAVI *et al.*, 2014) está presente em *C. sclopetarius* e *C. symmetricus*. Também não existem nenhum outro tipo de especialização dos pleópodes para essa função como os gonópodes presentes em outros crustáceos (BECKER *et al.*, 2012; BECKER *et al.*, 2013; TISEO *et al.*, 2014). Pode-se presumir que a fecundação ocorra externamente com os machos depositando a massa espermatóforica diretamente sobre a região ventral do cefalotórax das fêmeas, próximo aos gonóporos femininos como descrito por Hess e Bauer (2002).

Cerdas formando um arco ou rodeando completamente a periferia dos gonóporos estão presentes em muitas espécies de caranguejo ermitão (AMADIO; MANTELATTO, 2009; TIRELLI *et al.*, 2007; HESS; BAUER, 2002; BURANELLI; MANTELATTO, 2012; BURA-

NELLI *et al.*, 2014; TIRELLI *et al.*, 2010; SCELZO *et al.*, 2010) . As cerdas dos gonóporos masculinos de *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* são simples e curtas, diferente das cerdas longas e com cérdulas presentes em *Pa. exilis* (SCELZO *et al.*, 2010), *P. eremita* (TIRELLI *et al.*, 2010), *Pe. diogenes* (BURANELLI; MANTELATTO, 2012) e *D. insignis* (BURANELLI *et al.*, 2014). *Clibanarius erythropus* (TIRELLI *et al.*, 2007) também apresenta cerdas simples e curtas semelhantes às cerdas de *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* encontradas aqui. Entretanto, em *C. erythropus* estão presentes outros tipos de cerdas longas e compostas enquanto em *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* estão presentes apenas as cerdas simples e curtas.

Apesar dessas diferenças, a função dessas cerdas é provavelmente sensorial, ajudando o animal a localizar os gonóporos femininos no cefalotórax das fêmeas como proposto por outros autores (TIRELLI *et al.*, 2007).

Os sistemas reprodutores masculinos de *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* seguem o padrão básico descrito para crustáceos com testículos pares que continuam em vasos deferentes também pares (KROL *et al.*, 1992). Diferente do observado em outros grupos de crustáceos em que o sistema reprodutor masculino está localizado no cefalotórax (KROL *et al.*, 1992; LÓPEZ-GRECO *et al.*, 2007; SHINOZAKI-MENDES *et al.*, 2012; ZARA *et al.*, 2012; ROTLLANT *et al.*, 2012; BECKER *et al.*, 2013; NICOLAU *et al.*, 2012; GREGATI *et al.*, 2014; TISEO *et al.*, 2014; RAVI *et al.*, 2014; PILLAI *et al.*, 2014; ERKAN *et al.*, 2009b), o sistema reprodutor masculino das duas espécies deste estudo está localizado no posteriormente no pléon como observado em outras espécies de caranguejos ermitões (KROL *et al.*, 1992; AMADIO; MANTELATTO, 2009; BURANELLI; MANTELATTO, 2012; BURANELLI *et al.*, 2014; HESS; BAUER, 2002; LEMAITRE *et al.*, 2014; SANT'ANNA *et al.*, 2010; SANTOS; MANTELATTO, 2011; SCELZO *et al.*, 2010; TIRELLI *et al.*, 2007; TIRELLI *et al.*, 2010; TIRELLI *et al.*, 2013; TUDGE; LEMAITRE, 2004).

Embora os testículos sejam mantidos fortemente juntos pelo córtex testicular, não foi observada nenhuma comissura ligando os dois testículos como presentes em outros crustáceos (KROL *et al.*, 1992). Cada testículo parece ser um órgão independente que se liga a cada vaso deferente também independentes.

Os vasos deferentes podem apresentar formas variadas em diferentes grupos de crustáceos, mas essa variação não representa as relações filogenéticas dos grupos. Macroscopicamente os vasos deferentes de *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* podem ser divididos em VDP, VDM e VDD. Essa mesma subdivisão é observada em muitas espécies de Decapoda (KROL *et*

al., 1992; SHINOZAKI-MENDES *et al.*, 2012; AMADIO; MANTELATTO, 2009; TIRELLI *et al.*, 2007; ZARA *et al.*, 2012), mas difere de outras espécie da mesma família. Scelzo *et al.* (2010) descreveram apenas duas regiões do vaso deferente para *Pa. exilis*, uma proximal fina e enovelada e uma distal mais espessa e reta e Buranelli *et al.* (2014) descrevem todo o vaso deferente de *D. insignis* como apenas um tubo reto que conecta os testículos aos gonóporos.

5.2 Aspectos microscópicos

5.2.1 Testículos

Os testículos de crustáceos décapodes podem ser tubulares ou lobulares (KROL *et al.*, 1992). Os testículos de *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* são lobulares como em muitos outros décapodes (LÓPEZ-GRECO *et al.*, 2007; STEWART *et al.*, 2010; NICOLAU *et al.*, 2012; SHINOZAKI-MENDES *et al.*, 2012; ROTLLANT *et al.*, 2012; RAVI *et al.*, 2014). Os lobulos testiculares são revestidos por um córtex fibroso como o encontrado em *Libinia spinosa* (MOYANO *et al.*, 2010) e *Aratus pisonii* (NICOLAU *et al.*, 2012) o que difere do padrão geral para decápodes apresentado por Krol *et al.* (1992) com uma camada externa de tecido epitelial e uma camada interna de tecido conjuntivo. Outras espécies apresentam ainda outros tipos de estrutura do revestimento dos testículos. *Portunus pelagicus* apresenta apenas uma camada de tecido conjuntivo externa e uma camada membranosa interna (STEWART *et al.*, 2010; RAVI *et al.*, 2014).

Células germinativas de todos os estados podem ser entradas secções feitas em qualquer porção do testículo em sua extensão, não havendo uma diferenciação entre porção posterior e anterior do órgão como ocorre em *Portunus pelagicus* (STEWART *et al.*, 2010).

Em muitas espécies de crustáceos decápodes, cada lóbulo ou túbulos seminíferos apresentam três regiões distintas, uma zona germinativa, contendo espermatogônias, uma zona de maturação ou transformação, contendo espermatócitos e espermátides em diferentes estágios e uma ducto coletor onde são depositados os espermatozoides maduros (SIMEÓ *et al.*, 2009; MOYANO *et al.*, 2010; STEWART *et al.*, 2010; NICOLAU *et al.*, 2012; SHINOZAKI-MENDES *et al.*, 2012; BECKER *et al.*, 2013; RAVI *et al.*, 2014; TISEO *et al.*, 2014). Esse padrão não é observado em *C. sclopetarius* e *C. symmetricus*. Cada lóbulo dos testículos dessas espécies apresenta um ducto coletor, onde são depositados os espermatozoides e uma zona de transformação, que pode conter de um a dois tipos de células da linhagem germinativa com células

acessórias presentes em todos os lóbulos independe de qual célula germinativa está presente semelhante ao observado no lagostim australiano *Cherax quadricarinatus* (LÓPEZ-GRECO *et al.*, 2007; AN *et al.*, 2011). Também de forma semelhante a *Ch. quadricarinatus*, o tipo de célula da linhagem germinativa encontrada em um lóbulo é independente do tipo encontrado nos lóbulos adjacentes, dizendo-se então que a maturação ocorre de forma assíncrona entre os lóbulos, mas apresenta sincronia dentro de um mesmo lóbulo (KROL *et al.*, 1992).

As células acessórias (também chamadas de células enfermeiras, células nutritivas, células foliculares, células de Sertoli (KROL *et al.*, 1992)) ajudam a sustentar as células germinativas durante a sua maturação e em algumas espécies foi reportada como sendo responsável pela formação do lumen do ducto coletor (KROL *et al.*, 1992). Não foram encontradas evidências de que o epitélio escamoso do testículo de *C. sclopetarius* e de *C. symmetricus* apresentem atividade secretora. É mais provável que as células acessórias que se apresentam em proximidade com o ducto coletor sejam responsáveis pela formação da S1 que posteriormente será empacotada junto com os espermatozoides no interior do espermatóforo.

Apenas espermatozoides maduros são encontrados nos ductos coletores de *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* o que difere do observado por alguns autores para outros crustáceos em que espermátides são lançadas no ducto coletor e completam a maturação ao longo do ducto coletor e dos vasos deferentes (KROL *et al.*, 1992; ERKAN *et al.*, 2009a; STEWART *et al.*, 2010). Também não foram observadas diferenças entre os espermatozoides presentes nos ductos coletores e nos espermatóforos da região distal do vaso deferente.

A ultraestrutura de espermatozoides de crustáceos tem sido amplamente utilizada na taxonomia do grupo (TUDGE, 1997; TUDGE, 2009). Embora algumas características apomórficas do gênero *Clibanarius* como o anel do *perforatorium* (TUDGE, 1997) possam ser observadas com microscopia de luz, essa técnica não se mostrou eficiente para observação de estruturas importantes nas análises filogenéticas como a forma dos braços citoplasmáticos e conteúdos do citoplasma e núcleo (TUDGE, 1997; TUDGE, 2009).

5.2.2 Vasos deferentes

A parede do vaso deferente proximal de *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* é composta por um epitélio colunar alto e uma camada externa de tecido conjuntivo, como a descrição generalizada para décapodes (KROL *et al.*, 1992). Uma subdivisão em uma porção inicial e uma final do VDP também é descrita para o Portunídeo *Callinestes danae* (ZARA *et al.*, 2012).

Entretanto a diferenciação nessa espécie é marcada por um aumento na secreção de componentes da parede do espermatóforo e não por uma mudança do tipo de material secretado como em *C. sclopetarius* e *C. symmetricus*.

Assim como em muitas outras espécies de crustáceos (KROL *et al.*, 1992; SUBRAMONIAM, 1993), os espermatóforos começam a ser formados no VDP. Em *Ca. tibicen*, o VDP já contém ampolas esféricas ligadas por pedestais (AMADIO; MANTELATTO, 2009) e em *Pe. diogenes* os todas as estruturas do espermatóforos já estão formadas no vaso deferente proximal, sendo observado apenas um alongamento do pedúnculo nas regiões seguintes (BURANELLI; MANTELATTO, 2012). Em contraste com o observado para essas espécies, no VDP de *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* os espermatóforos se apresentam apenas como tubos contínuos sem haver separação em ampolas ou formação de outras estruturas do espermatóforo. As observações de Santos e Mantelatto (2011) também confirmam isso para *C. sclopetarius*.

Na transição entre o VDP e o VDM, os espermatóforos são moldados em pequenos pacotes, formando as ampolas. Isso também foi observado para *P. eremita* (TIRELLI *et al.*, 2010) e *C. erythropus* (TIRELLI *et al.*, 2007). Nessas espécies, ao longo do VDM são formadas o pedestal e a haste do espermatóforo, estruturas que estão ausentes em *C. sclopetarius* e *C. symmetricus*. No VDM das espécies estudadas aqui, é formada uma secreção, chamada aqui de S4, de material proteico semelhante à parede do espermatóforo, exceto pela ausência de fibras colágenas. Seria possível argumentar que essa secreção é adicionada à estrutura do espermatóforo, como observado materiais produzidos pelo VDM de *Clibanarius erythropus*, *Pe. diogenes*, *Ca. tibicen*, *P. eremita*, *Eupagurus herthurdus* e *D. asper* (TIRELLI *et al.*, 2007; AMADIO; MANTELATTO, 2009; BURANELLI; MANTELATTO, 2012; TIRELLI *et al.*, 2010; SUBRAMONIAM, 1993). O que poderia ser fortalecido pela coloração diferencial entre as projeções laterais e as ampolas com o Rosa Bengala no espermatóforos de *C. symmetricus*. Entretanto, essa diferença na coloração é mais provavelmente consequência do acúmulo de espermatozoides e S1 que é maior nas ampolas. É mais provável que as projeções laterais dos espermatóforos de *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* seja formada pela própria SW produzida no VDP, através da atividade muscular que molda os espermatóforos em ampolas, sendo a S4, uma das secreções seminais que se liga aos espermatóforos e ajudam a fixá-los no corpo das fêmeas após a cópula.

Em algumas espécies de crustáceos, o VDD não contém espermatóforos, tendo a função apenas de produzir secreções seminais (KROL *et al.*, 1992; MOYANO *et al.*, 2010;

BECKER *et al.*, 2013). Em outras, foi reportado que o VDD tem a função apenas de armazenar os espermatozoides e expulsá-los no momento da cópula (TIRELLI *et al.*, 2007; AMADIO; MANTELATTO, 2009; BURANELLI; MANTELATTO, 2012; TIRELLI *et al.*, 2010), mas alguns desses estudos buscavam investigar apenas a formação do espermatozoide, sem observações sobre outros materiais secretados. Em *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* o VDD armazena os espermatozoides maduros, mas também produz uma nova secreção que é adicionada às secreções seminais.

Hess e Bauer (2002) ao estudar a cópula entre indivíduos de *C. vitattus* descreve uma secreção seminal formada por um material opaco, mucoso e adesivo que ajuda a manter os espermatozoides ligados ao corpo da fêmea até que elas liberem os óvulos que passam por essa massa espermatozoética, causando a abertura dos espermatozoides e liberação dos espermatozoides. Aqui nós observamos que a massa espermatozoética é formada pelos espermatozoides e pelo menos mais quatro secreções (S3, S4, S5 e S6) que formam os fluidos seminais. Estudos mais detalhados precisariam ser feitos para conhecer qual a função específica de cada uma dessas secreções no momento da cópula, mas a disposição da S4, sempre unida a porção mais basal dos espermatozoides a torna candidata mais provável a ser a principal responsável pela ligação dos espermatozoides ao corpo das fêmeas. Às demais secreções são atribuídas as funções de: a) ajudar na saída da massa espermatozoética através dos gonóporos, b) prover um meio extra de proteção dos espermatozoides e c) ajudar a S4 nessa função de ligação ao corpo das fêmeas.

5.2.3 Espermatozoides

O espermatozoide de *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* consistem em apenas um cordão de ampolas ligadas umas às outras por projeções laterais. O mesmo foi observado para *C. sclopetarius* por Santos e Mantelatto (2011). O espermatozoide de *C. symmetricus* ainda não havia sido descrito desde a sua desambiguação com *C. vitattus* por Lemaitre *et al.* (2014).

Os espermatozoides típicos da família Diogenidae consistem em uma ampola que contém os espermatozoides, um pedúnculo ou haste longo e fino e um pedestal (TUDGE, 1991). Espermatozoides não pedunculados em Diogenidae foram observados em apenas quatro espécies do gênero *Clibanarius*: *C. longitarsus* (UMA; SUBRAMONIAM, 1984), *C. vitattus* (HESS; BAUER, 2002), *C. sclopetarius* (SANTOS; MANTELATTO, 2011) e *C. symmetricus* (Esse estudo). Entretanto, a formação do cordão de espermatozoides em *C. longitarsus* é diferente do observado nas outras três espécies. Nestas, as ampolas são ligadas umas às outras por

projeções laterais da própria ampola, enquanto que em *C. longitarsus* Uma e Subramoniam (1984) descrevem um cordão gelatinoso que se insere numa invaginação central na base dos espermatóforos mantendo estes ligados. Portanto, a morfologia do espermatóforo revela uma proximidade entre *C. sclopetarius*, *C. symmetricus* e *C. vitattus*, mas o padrão não pedunculado de *C. longitarsus* parece ter evoluído independentemente do dessas três espécies, diferente do proposto por Santos e Mantelatto (2011).

Entre *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* não foi observada nenhuma diferença marcante na morfologia do espermatóforo. No método utilizado foi observada a morfologia apenas de espermatóforos já ejaculados encontrados próximo ao gonóporo de alguns poucos indivíduos. O baixo número não permitiu uma comparação adequada entre os caracteres morfométricos dos espermatóforos entre as duas espécies. Parece haver uma diferença no número de espermatozoides por espermatóforo, mas o método utilizado não era adequado para a contagem de espermatozoides com precisão. Estudos futuros com os espermatóforos de *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* devem ser conduzidos para esclarecimento dessas lacunas.

A função do pedúnculo dos espermatóforos de caranguejos-ermitões não é clara. De acordo com Subramoniam (1993) o pedúnculo pode ajudar no alcance dos ovócitos no momento em que eles saem dos gonóporos femininos e passam pela massa espermatofórica. Em Diogenidae, a massa espermatofórica é depositada no corpo das fêmeas ou no interior das conchas de gastrópodes que elas utilizam (TUDGE, 1991). Nesse caso, talvez a presença de um espermatóforo pedunculado seja mais necessária. Em *C. vitattus* Hess e Bauer (2002) observaram que a massa espermatofórica é depositada diretamente sobre o corpo da fêmeas, próximo aos gonóporos femininos. É provável que a cópula em *C. sclopetarius* e *C. symmetricus* ocorra da mesma forma que ocorre nessa espécie, baseado na proximidade entre elas e nas características em comum da morfologia dos gonóporos e dos espermatóforos entre as três espécies.

6 CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

Os sistemas reprodutores masculinos de *Clibanarius sclopetarius* e *C. symmetricus* são muito semelhantes. Consistem em um parte de testículos e um par de vasos deferentes. A morfologia dos gonóporos e dos espermatóforos permitem inferir que a cópulas do indivíduos ocorre de forma semelhantes à de *C. vitattus* com a massa espermatofórica sendo depositada diretamente sobre o corpo da fêmea e ficando ligado a ela até a liberação dos ovócitos para fecundação. Essa ligação é auxiliada pelas secreções do VD.

Estudos futuros devem buscar esclarecer algumas questões como o mecanismo de abertura dos gonóporos e a formação da linha lateral dos espermatóforos. Estudos com um maior número de espermatóforos são importante para realizar um comparação na morfologia do espermatóforo entre as duas espécies.

REFERÊNCIAS

- AMADIO, L. M.; MANTELATTO, F. L. M. Description of the Male Reproductive System of the Hermit Crab *Calcinus Tibicen* (Decapoda: Anomura: Diogenidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 29, n. 4, p. 466–475, 2009.
- AN, C.-G.; WENG, X.-L.; XU, Y.-Z.; FAN, Y.-J.; ZHAO, Y.-L. Histological and Ultrastructural Studies on the Male Reproductive System and Spermatogenesis in the Red Claw Crayfish, *Cherax quadricarinatus*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 31, n. 2, p. 223–230, 2011.
- BECKER, C.; KLAUS, S.; TUDGE, C. C. Male internal reproductive structures of european pea crabs (Crustacea, decapoda, brachyura, pinnotheridae): Vas deferens morphology and spermatozoal ultrastructure. **Journal of Morphology**, v. 274, n. 11, p. 1312–1322, 2013.
- BECKER, C.; TÜRKAY, M.; BRANDIS, D. The male copulatory system of european pea crabs (crustacea, brachyura, pinnotheridae). **Journal of Morphology**, v. 273, n. 11, p. 1306–1318, 2012.
- BEHMER, O. A.; TOLOSA, E. M. C. d. **Manual de técnicas para histología normal e patológica**. [S.l.: s.n.], 2003.
- BURANELLI, R. C.; MANTELATTO, F. L. M. Reproductive apparatus of the male giant hermit crab *Petrochirus diogenes* (Anomura, Diogenidae): Morphology and phylogenetic implications. **Aquatic Biology**, v. 16, n. 3, p. 241–251, 2012.
- BURANELLI, R. C.; ZARA, F. J.; MANTELATTO, F. L. M. Male reproductive system of the red brocade hermit crab *Dardanus insignis* (Diogenidae) and its relationship to other family members. **Zoomorphology**, v. 133, n. 2, p. 127–137, 2014.
- COBOS, V.; DÍAZ, V.; RASO, J. E. G.; MANJÓN-CABEZA, M. E. The male reproductive system of *Hippolyte inermis* Leach 1815 (Decapoda, Caridea). **Helgoland Marine Research**, v. 65, n. 1, p. 17–24, 2011.
- ERKAN, M.; BALKIS, H.; TUNALI, Y.; OLIVERIA, E. Morphology of Testis and Vas Deferens in the Xanthoid Crab, *Eriphia Verrucosa* (Forskål, 1775) (Decapoda: Brachyura). **Journal of Crustacean Biology**, v. 29, n. 4, p. 458–465, 2009.
- ERKAN, M.; TUNALI, Y.; SANCAR-BAS, S. Male reproductive system morphology and spermatophore formation in *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823) (Decapoda: Astacidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 29, n. 1, p. 42–50, 2009.
- GREGATI, R. A.; FRANSOZO, V.; LÓPEZ-GRECO, L. S.; NEGREIROS-FRANSOZO, M. L.; BAUER, R. T. Functional morphology of the reproductive system and sperm transfer in *Stenopus hispidus* (Crustacea: Decapoda: Stenopodidea), and their relation to the mating system. **Invertebrate Biology**, v. 133, n. 4, p. 381–393, 2014.
- HESS, G. S.; BAUER, R. T. Spermatophore transfer in the hermit crab *Clibanarius vittatus* (Crustacea, Anomura, Diogenidae). **Journal of Morphology**, v. 253, n. 2, p. 166–175, 2002.
- JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA, L. **Técnicas básicas de citologia e histologia**. São Paulo: Santos, 1983.

KROL, R. M.; HAWKINGS, W. E.; OVERSTREET, R. M. Reproductive components. In: **Microscopic Anatomy of Invertebrates, Decapod Crustacea**. [S.l.]: Wiley, 1992, (Microscopic Anatomy of Invertebrates). cap. 8, p. 295–343.

LEMAITRE, R.; NEGRI, M.; MANTELATTO, F. L. Molecular and morphological resurrection of *Clibanarius symmetricus* (Randall, 1840), a cryptic species hiding under the name for the “thin stripe” hermit crab *C. vittatus* (Bosc, 1802) (Decapoda: Anomura: Diogenidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 34, n. 6, p. 848–861, 2014.

LÓPEZ-GRECO, L. S.; VAZQUEZ, F.; RODRÍGUEZ, E. M. Morphology of the male reproductive system and spermatophore formation in the freshwater ‘red claw’ crayfish *Cherax quadricarinatus* (Von Martens, 1898) (Decapoda, Parastacidae). **Acta Zoologica**, v. 88, p. 223–229, 2007.

MANJÓN-CABEZA, M. E.; COBOS, V.; García Raso, J. E. The reproductive system of *Hippolyte niezabitoskii* (Decapoda, Caridea). **Zoology**, v. 114, n. 3, p. 140–149, 2011.

MELO, G. A. S. de. **Manual de identificação dos Crustacea Decapoda do litoral brasileiro: Anomura, Thalassinidea, Palinuridea, Astacidea**. [S.l.]: Editora Plêiade; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, 1999.

MOYANO, M. P.; GAVIO, M. A.; CUARTAS, E. I. Morphology and function of the reproductive tract of the spider crab *Libinia spinosa* (Crustacea, Brachyura, Majoidea): Pattern of sperm storage. **Helgoland Marine Research**, v. 64, n. 3, p. 213–221, 2010.

NICOLAU, C. F.; NASCIMENTO, A. A.; MACHADO-SANTOS, C.; SALES, A.; OSHIRO, L. M. Y. Gonads of males and females of the mangrove tree crab *Aratus pisonii* (Grapsidae: Brachyura: Decapoda): A histological and histochemical view. **Acta Zoologica**, v. 93, n. 2, p. 222–230, 2012.

PEARSE, A. G. **Histochemistry theoretical and applied**. [S.l.]: Little, Brown And Company.; Boston, 1953.

PILLAI, S. L.; NASSER, M.; SANIL, N. K. Histology and ultrastructure of male reproductive system of the Indian Spiny lobster *Panulirus homarus* (Decapoda: Palinuridae). **Rev Biol Trop**, v. 62, n. 2, p. 533–541, 2014.

POLJAROEN, J.; VANICHVIRIYAKIT, R.; TINIKUL, Y.; PHOUNGPETCHARA, I.; LINTHONG, V.; WEERACHATYANUKUL, W.; SOBHON, P. Spermatogenesis and distinctive mature sperm in the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (De Man, 1879). **Zoologischer Anzeiger**, v. 249, n. 2, p. 81–94, 2010.

RAVI, R.; MANISSERI, M. K.; SANIL, N. K. Structure of the male reproductive system of the blue swimmer crab *Portunus pelagicus* (Decapoda: Portunidae). **Acta Zoologica**, v. 95, n. 2, p. 176–185, 2014.

ROTLANT, G.; CHIVA, M.; DURFORT, M.; RIBES, E. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the Norway lobster *Nephrops norvegicus* (Decapoda: Astacidea). **Journal of Morphology**, v. 273, n. 6, p. 572–585, 2012.

SANT’ANNA, B. S.; TURRA, A.; ZARA, F. J. Simultaneous activity of male and female gonads in intersex hermit crabs. **Aquatic Biology**, v. 10, n. 3, p. 201–209, 2010.

- SANTOS, N.; MANTELATTO, F. L. M. Reproductive system of the male hermit crab *Clibanarius scolopetarius*: gonopore, spermatophore, and spermatozoal morphologies. **Aquatic Biology**, v. 12, n. 3, p. 271–280, 2011.
- SCELZO, M. A.; FANTUCCI, M. Z.; MANTELATTO, F. L. M. Spermatophore and gonopore morphology of the southwestern-Atlantic hermit crab *Pagurus exilis* (Benedict, 1892) (Anomura, Paguridae). **Zoological Studies**, v. 49, n. 3, p. 421–433, 2010.
- SCELZO, M. A.; MANTELATTO, F. L.; TUDGE, C. C. Spermatophore morphology of the endemic hermit crab *Loxopagurus loxochelis* (Anomura, Diogenidae) from the southwestern Atlantic—Brazil and Argentina. **Invertebrate reproduction & development**, Taylor & Francis, v. 46, n. 1, p. 1–9, 2004.
- SHINOZAKI-MENDES, R. A.; SILVA, J. R.; HAZIN, F. H. Development of male reproductive system of the blue land crab *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1828 (Decapoda: Gecarcinidae). **Acta Zoologica**, v. 93, n. 4, p. 390–399, 2012.
- SIMEÓ, C. G.; RIBES, E.; ROTLLANT, G. Internal anatomy and ultrastructure of the male reproductive system of the spider crab *Maja brachydactyla* (Decapoda: Brachyura). **Tissue and Cell**, v. 41, n. 5, p. 345–361, 2009.
- SOUZA, L. P. de; SILVA, J. R.; ARAUJO, A. M.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphology of the female genital ducts of the blue land crab *Cardisoma guanhumi* (Crustacea: Brachyura: Gecarcinidae). **Acta Zoologica**, Wiley Online Library, v. 94, n. 3, p. 300–307, 2013.
- STEWART, M. J.; STEWART, P.; SOONKLANG, N.; LINTHONG, V.; HANNA, P. J.; DUAN, W.; SOBHON, P. Spermatogenesis in the blue swimming crab, *Portunus pelagicus*, and evidence for histones in mature sperm nuclei. **Tissue and Cell**, Elsevier Ltd, v. 42, n. 3, p. 137–150, 2010.
- SUBRAMONIAM, T. Spermatophores and sperm transfer in marine crustaceans. **Advances in marine biology**, Elsevier, v. 29, p. 129–214, 1993.
- TIRELLI, T.; CAMPANTICO, E.; PESSANI, D.; TUDGE, C. C. Reproductive Biology of Mediterranean Hermit Crabs: Male Reproductive Apparatus of *Clibanarius erythropus* (Decapoda Anomura). **Journal of Crustacean Biology**, v. 27, n. 3, p. 404–410, 2007.
- TIRELLI, T.; GAMBA, M.; PESSANI, D.; TUDGE, C. C. Spermatophore and spermatozoal ultrastructure of the Mediterranean hermit crab *Pagurus excavatus* (Paguridae: Anomura: Decapoda). **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 93, n. 05, p. 1363–1371, 2013.
- TIRELLI, T.; SILVESTRO, D.; PESSANI, D.; TUDGE, C. C. Description of the male reproductive system of *Paguristes eremita* (Anomura, Diogenidae) and its placement in a phylogeny of diogenid species based on spermatozoal and spermatophore ultrastructure. **Zoologischer Anzeiger**, Elsevier, v. 248, n. 4, p. 299–312, 2010.
- TISEO, G. R.; ZARA, F. J.; MANTELATTO, F. L. M. 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**, v. 34, n. 6, p. 704–716, 2014.

TUDGE, C. Spermatophore diversity within and among the hermit crab families, coenobitidae, diogenidae, and paguridae (paguroidea, anomura, decapoda). **The Biological Bulletin**, Marine Biological Laboratory, v. 181, n. 2, p. 238–247, 1991.

TUDGE, C. C. Phylogeny of the anomura (decapoda, crustacea): Spermatozoa and spermatophore morphological evidence. **Contributions to Zoology**, ARTIS LIBRARY, v. 67, p. 125–142, 1997.

TUDGE, C. C. Spermatozoal morphology and its bearing on decapod phylogeny. In: **Decapod Crustacean Phylogenetics**. [S.l.]: CRC press, 2009. cap. 8, p. 101–120.

TUDGE, C. C.; LEMAITRE, R. Studies of Male Sexual Tubes in Hermit Crabs (Crustacea, Decapoda, Anomura, Paguroidea). I. Morphology of the Sexual Tube in *Micropagurus acantholepis* (Stimpson, 1858), with Comments on Function and Evolution. **Journal of Morphology**, v. 259, n. 1, p. 106–118, 2004.

TURRA, A.; LEITE, F. P. Shell utilization patterns of a tropical intertidal hermit crab assemblage. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, Cambridge University Press, v. 82, n. 1, p. 97–107, 2002.

UMA, K.; SUBRAMONIAM, T. A COMPARATIVE STUDY ON THE SPERMATOPHORE IN *SCYLLA SERRATA* (FORSKAL) (DECAPODA : BRACHYURA) AND *CLIBANARUS LONGITARSUS* (DE HAAN) (DECAPODA : ANOMURA). **J. mar. biol. Ass. India**, v. 26, n. 1, p. 103–108, 1984.

ZARA, F. J.; TOYAMA, M. H.; CAETANO, F. H.; LÓPEZ-GRECO, L. S. Spermatogenesis, Spermatophore, and Seminal Fluid Production in the Adult Blue Crab *Callinectes danae* (Portunidae). **Journal of Crustacean Biology**, v. 32, n. 2, p. 249–262, 2012.