



Universidad Austral de Chile

Escuela de Biología Marina

Profesor Patrocinante:
Dr. Oscar R. Chaparro
Instituto de Ciencias Marinas y
Limnológicas
Facultad de Ciencias.

**EMBRIONES ENCAPSULADOS DE *Acanthina monodon*
(PALLAS 1774): ¿UN ENVOLTORIO QUÉ CAMBIA CON
EL TIEMPO?**

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Biología Marina y
Título Profesional de *Biólogo Marino*.

JOSELINE ANDREA BÜCHNER MIRANDA

VALDIVIA - CHILE

2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la fortaleza y consuelo en los momentos de flaqueza.

A mis padres, Sandra y Javier, por su amor incondicional y por apoyar desde el primer momento mi decisión de optar por esta bella carrera, ayudándome a superar los obstáculos y las circunstancias difíciles de la vida, aunque el camino haya sido cuesta arriba. Quiero destacar que en gran parte, gracias a ellos, he logrado cumplir esta meta que les prometí finalizar.... por eso, les dedico este trabajo y dedicaré muchos más. También, a mis hermanos, Estephanía, Javier, Nicolás y Andrés que me supieron comprender y siempre me alentaron a seguir, dándome la energía suficiente para no bajar los brazos.

En el ámbito académico quiero destacar y agradecer a mi profesor, el Dr. Oscar Chaparro por acogerme y por la confianza que me brindó, dándome la oportunidad de desarrollar mi tesis y por permitirme ser parte de su equipo de trabajo. Gracias por todos los consejos, no sólo relacionado a mi formación como profesional, sino también por aquellas conversaciones sobre anécdotas de vida mientras disfrutábamos de un buen café. También debo agradecer a Paola y Daniela, por la paciencia y buena disposición en el laboratorio, sin su ayuda este trabajo no habría sido posible. Asimismo, agradecer a mi partner Luis (toto), quien fue el primero en abrirme los brazos para realizar mi tesis en el laboratorio, además de ser mi compañero de terreno y aventuras, gracias por la alegría que siempre contagias.

También agradecer a mis amigos y compañeros de Biología Marina más cercanos, sobre todo por su apoyo en este último tiempo. Mil gracias.

Finalmente, agradezco al proyecto Fondecyt 1141052 por el financiamiento de mi trabajo de tesis.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	5
1. RESUMEN	8
2. ABSTRACT	10
3. INTRODUCCIÓN	12
4. HIPÓTESIS DEL TRABAJO	15
5. OBJETIVOS	16
5.1. Objetivo general	16
5.2. Objetivos específicos	16
6. MATERIALES Y MÉTODOS	17
6.1. Obtención de muestras	17
6.2. Análisis gravimétricos de cápsulas y embriones	18
6.3. Análisis histológicos de las paredes capsulares	19
6.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB)	19
6.5. Cuantificación de proteínas totales de las paredes capsulares, líquido intracapsular y embriones	20
6.6. Análisis estadísticos	21
7. RESULTADOS	22
7.1. Análisis gravimétricos: Paredes capsulares y embriones encapsulados	22
7.2. Análisis histológicos y microscopía electrónica de barrido: Paredes capsulares, tapón de eclosión y prolongaciones capsulares	22

7.3. Proteínas totales de las paredes capsulares, líquido intracapsular y embriones	23
8. DISCUSIÓN	25
8.1. Análisis gravimétricos	25
8.2. Histología y microscopía electrónica de barrido (MEB)	28
8.3. Cuantificación de proteínas totales	29
9. CONCLUSIONES	46
10. BIBLIOGRAFÍA	47

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lugar de obtención de las cápsulas en la playa de Calfuco, Región de Los Ríos. Fuente: google Earth. **32.**

Figura 2. *A. monodon*. Cápsulas y estadios de desarrollo embrionarios usados en los experimentos. (A) Cápsulas de *A. monodon*, (B) estadio inicial o huevo, (C) estadio trocófora, (D) véliger inicial (rango tamaño long. concha: 500-750 μm), (E) véliger avanzada (rango tamaño long. concha: 790-920 μm), (F) juvenil pre-eclosión (rango tamaño long. concha: 1000-1100 μm). **33.**

Figura 3. *A. monodon*. (A) Peso seco de las paredes de cápsulas conteniendo embriones con diferentes estadios de desarrollo, N = 50. huevo: 2.63 ± 0.43 mg (promedio \pm desv. estándar (DE)); trocófora: 2.58 ± 0.33 mg (promedio \pm DE), (B) Peso seco por embrión con diferentes niveles de desarrollo encapsulado, N = 44. huevo: 0.038 ± 0.008 mg (promedio \pm DE); trocófora: 0.048 ± 0.0063 mg (promedio \pm DE). Líneas horizontales indican rango longitud de concha. Las ecuaciones fueron estimadas usando sólo la información de los estadios encapsulados que tienen concha larval desarrollada. **34.**

Figura 4. *A. monodon*. Peso orgánico e inorgánico de paredes de cápsulas que contenían embriones con diferentes niveles de desarrollo. N = 49. Contenido orgánico huevo: 2.38 ± 0.39 mg (promedio \pm DE); trocófora: 2.3 ± 0.34 mg (promedio \pm DE). Contenido inorgánico huevo: 0.25 ± 0.14 mg (promedio \pm DE), trocófora: 0.28 ± 0.14 mg (promedio \pm DE). Líneas horizontales indican rango longitud de concha. Las ecuaciones fueron estimadas usando solo la información de los estadios encapsulados que ya han desarrollado la concha larval. **35.**

Figura 5. *A. monodon*. Secciones histológicas de la pared capsular con identificación de las capas que las conforman (A) cápsulas conteniendo estadio inicial (huevo). (B) cápsulas conteniendo estadio de juvenil pre-eclosión. C1: capa interna, C2: capa intermedia, C3: capa externa. (\rightarrow): Indica el sector medio de la capa intermedia con presencia de vacuolas. Aumento de 40X. **36.**

Figura 6. *A. monodon*. Secciones histológicas de cápsulas con (A) embriones en estadio huevo y (B) juveniles pre-eclosión. (→): Indican las prolongaciones de la pared externa de las cápsulas. Aumento 40X. **37.**

Figura 7. *A. monodon*. (A) Longitud y (B) Área (promedio \pm DE) de las prolongaciones de la capa externa de las cápsulas durante el desarrollo embrionario. N = 29. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significantes. **38.**

Figura 8. *A. monodon*. (A) Área del tapón de eclosión (promedio \pm DE) de acuerdo al avance del desarrollo intracapsular de los embriones. Las estimaciones del área del tapón fueron hechas a partir de sección histológicas verticales que cruzaron en la región media del tapón. (B) Variación porcentual del área del tapón de eclosión a medida que avanza el periodo de desarrollo. Las estimaciones fueron hechas usando como referencia el área del tapón en cápsulas recién puestas. N = 24. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significantes. **39.**

Figura 9. *A. monodon*. (A) Corte histológico en sección vertical, pasando a través de la sección media del tapón de eclosión en cápsulas con estadio inicial (huevo) y (B) en el estadio de juvenil pre-eclosión. (→): Indica el tapón capsular. Aumento de 10X. **40.**

Figura 10. *A. monodon*. Espesor de la pared capsular obtenidas con microscopía electrónica de barrido en estadio de huevo. C1: Corresponde a la pared interna, C2: Pared intermedia y C3: pared externa. (→ Negra): Indican las vacuolas en la zona media de la capa intermedia, (→ Blanca): Prolongación de la pared externa. **41.**

Figura 11. *A. monodon*. (A) Espesor de cada una de las capas de la pared (promedio \pm DE) en cápsulas con diferentes estadios de desarrollo embrionario. (B) Cambios porcentuales en el espesor de las capas interna, intermedia y externa en cápsulas conteniendo distintos niveles de desarrollo embrionario. N = 14. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significantes. **42.**

Figura 12. *A. monodon*. Proteínas totales (promedio \pm DE) en las paredes capsulares con el avance del desarrollo embrionario. N = 37. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significantes. **43.**

Figura 13. *A. monodon*. Proteínas totales (promedio \pm DE) en el líquido intracapsular de cápsulas con diferentes niveles de desarrollo embrionario y proteínas totales en el agua de mar. N = 50. (*) = valores cercanos a cero. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significantes. **44.**

Figura 14. *A. monodon*. A) Proteínas totales por embrión (promedio \pm DE), de acuerdo al nivel de desarrollo. B) Proteínas totales promedios en huevos nutricios (promedio \pm DE). N = 37. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significantes. **45.**

1. RESUMEN

El proceso de encapsulamiento en gastrópodos marinos es una estrategia que permite ofrecer protección a la progenie, independiente si existe un cuidado parental. Las paredes capsulares son multilaminadas y pueden variar sus dimensiones durante el desarrollo encapsulado. Igualmente, se ha identificado un beneficio nutricional de las paredes capsulares, mediante el aporte de materia orgánica disuelta (MOD) hacia el fluido intracapsular debido a una disolución de las mismas. Aunque, el origen real de la MOD, no está del todo claro, tampoco es conocido su incidencia en el fluido intracapsular ni en los cambios embrionarios que esto pudiera representar.

En la presente investigación, se examinaron las paredes capsulares del gastrópodo *Acanthina monodon* en su composición gravimétrica (peso seco, orgánico e inorgánico), bioquímica (proteínas totales) y en las características microscópicas (histología y microscopía electrónica de barrido). Los análisis incluyeron posturas conteniendo desove en estadio huevo hasta la etapa de juvenil pre-eclosión. En el análisis bioquímico se cuantificaron las proteínas totales de las paredes capsulares, del fluido intracapsular y de los embriones encapsulados.

La pared de la cápsula está compuesta de 3 capas: 1) Una fina capa externa con proyecciones al exterior, 2) una capa intermedia más gruesa, con vacuolas en su sección media, y 3) una fina capa interna que da origen al tapón de eclosión. Las paredes capsulares pierden peso a través del desarrollo embrionario y esta pérdida alcanzó un valor de aprox. 27.2 %. El contenido inorgánico de las paredes capsulares disminuyó en 64%, alteración, que pareciera asociarse al desgaste de la pared externa (ej. disminución de las prolongaciones de la pared externa) por erosión del oleaje del intermareal. La fracción orgánica de las paredes capsulares (> 85% del peso total) disminuyó en un 23.3% durante el encapsulamiento, y dicha pérdida de materia orgánica estaría representada principalmente por proteínas, las cuales se redujeron en un 52.8% respecto del valor inicial. La capa interna se adelgazó durante el desarrollo embrionario, perdiendo alrededor del 35.2% de su espesor inicial, en tanto que el tapón, en cápsulas con embriones en estadio de pre-eclosión, retuvo sólo el 2% de la superficie inicial. Las proteínas corresponden a uno de los principales componente de la pared

capsular. Por su parte, las proteínas totales en el líquido intracapsular decrecieron con el avance del desarrollo embrionario en un 54%. Adicionalmente, el peso seco de los juveniles encapsulados antes de la eclosión, incrementó un 96.5% respecto del estadio huevo. Mientras que el contenido de proteínas totales en embriones aumentó un 148.3% en el estadio de véliger avanzado comparado con los embriones de huevo. Asimismo, el estadio de juvenil pre-eclosión disminuyó respecto de las velígeras avanzadas, situación que pareciera asociarse al costo energético de la metamorfosis que se lleva a cabo en el interior de la cápsula, previo a la eclosión de los juveniles.

De acuerdo a nuestros resultados, la capa externa sufre desgaste desde el exterior, en tanto que la capa interna de la cápsula se disuelve y / o desintegra hacia el interior, a medida que avanza el desarrollo embrionario. Esta disolución puede proporcionar MOD, principalmente como proteínas, al fluido intracapsular y ellas estarían disponibles para los embriones que se desarrollan en el interior de las cápsulas. Esta MOD representaría una fuente de nutrición complementaria a los huevos nutricios, y los embriones encapsulados podrían hacer uso de ella, especialmente en la etapa media final del encapsulamiento, después de finalizada la ingesta de los huevos nutricios.

2. ABSTRACT

The encapsulation process in marine gastropods is a strategy that allows protection to the progeny, independent if there is parental care. Likewise, a nutritional benefit of the capsular walls has been identified by mean the contribution of dissolved organic matter (DOM) to the intracapsular fluid due to the dissolution of the internal capsular walls. The presently, origin of the DOM is neither entirely clear, or is it known its incidence in the intracapsular fluid composition that the embryonic changes that this could represent.

In the present research capsule walls of the gastropod *Acanthina monodon* were studied by assessing its of gravimetric characteristics (total dry weight, organic and inorganic components), biochemical analysis, histological aspects and scanning electron microscopy. All analyzes were carried on capsules with different development stages, from early capsules (egg stages) to the most advanced encapsulated juvenile (pre-hatching stage). During biochemical analysis, we quantified the total protein content of the capsular walls, but also for intracapsular fluid and embryos.

The wall of the capsule is composed by 3 layers: 1) A thin outer layer with projections to the outside, 2) a thicker middle layer with vacuoles in its middle section, and finally 3) a thin inner layer that gives rise to the hatching plug. The capsular walls lose weight (approx. 27.2%) through the embryonic development. The inorganic content of the capsular walls decreased by 64%, change that seems to be associated with the reduction in area of the external wall projections (eg. decrease of external wall extensions) due to erosion caused by the sea waves. The organic fraction of the capsular walls decreased by 23.3% during encapsulation, and this loss of organic matter would be represented mainly by proteins, which were reduced by 52.8%, in juvenile just before hatching. The inner thinned layer lost about 35.2% of its initial thickness, while the area of the capsule plug was reduced down to 2% at the juvenile pre-hatching stage. Proteins were the main component of the capsular wall. The total protein content in the intracapsular fluid decreased (54%) with the advance of the embryonic development. Dry weight of encapsulated juvenile, increased by 96.5% before hatching, while its total protein content increased by 148.3% when advanced veligers were compared to the egg stage.

Meanwhile, in the pre-hatching juvenile stage, the protein content showed a decreased with respect to the advanced veligers, a situation that seems to be associated with the energy cost of the metamorphosis that they perform before hatch from capsule.

Thus, it is evident that the outer layer undergo erosion of the external projections, while the inner layer of the capsule dissolves as larval development progresses. This dissolution could potentially provide DOM to the intracapsular fluid making it available to the embryos that develop inside capsules. In this way, encapsulated embryos would have an additional source of nutrition, in addition to the nurse eggs.

3. INTRODUCCIÓN

Los invertebrados marinos bentónicos presentan una gran diversidad de especies y una amplia gama de patrones reproductivos. Muchas de las especies se dispersan por medio de larvas planctónicas que pueden pasar semanas o meses en la columna de agua antes de llevar a cabo el asentamiento y la metamorfosis (Thorson 1950; Vance 1973; Scheltema 1986). Sin embargo, otras especies evitan o reducen la etapa larvaria de vida libre, donde los embriones se desarrollan al interior de estructuras envolventes hasta alcanzar la etapa de larva véliger o de juvenil, estadios de desarrollo en los cuales la prole eclosiona desde las cápsulas. Estas estructuras pueden ser cápsulas multilaminadas firmes o masas-cintas gelatinosas frágiles (Fretter & Graham 1994), los cuales son secretadas y depositadas en el sustrato por la madre y pueden o no tener cuidado parental físico (Thorson 1950; Pechenik 1986; Collin 2003; Chaparro *et al.* 2008, 2011).

La encapsulación permite el desarrollo bentónico de los embriones, modo de desarrollo particularmente común en poliquetos y moluscos gastrópodos (Pechenik 1979). Las cápsulas han sido descritas como químicamente complejas y enérgicamente costosas (Pechenik 1986) y se las ha identificado como mecanismos de protección para los embriones contra la desecación y la depredación (Pechenik 1979), el estrés osmótico (Pechenik 1982, 1983), los microorganismos (Pechenik *et al.* 1984; Lord 1986), la irradiación UV (Rawlings 1996), aumenta la probabilidad de que los descendientes permanezcan en el área de los padres (Chapman 1965; Gibbs 1968; Rivest 1983) y además, favorecen el aumento de la supervivencia embrionaria, que debe ser muy alta para compensar los altos costos asociados a esta estrategia (Pechenik 1986).

El proceso reproductivo demanda una importante porción de la energía materna, ya sea en el cuidado embrionario, pero también en la energía utilizada tanto para la formación de los gametos como para la producción de las estructuras envolventes. A lo anterior, debe adicionarse el gasto materno en la generación de alimento extraembrionario, como por ejemplo huevos nutricios, los que servirán como sustrato energético complementario para los embriones durante el desarrollo intracapsular (Gallardo & Garrido 1987; Chaparro & Paschke 1990). También, se puede adicionar como costo

materno, la incorporación de sustancias orgánicas disueltas en el líquido intracapsular que baña a los embriones encapsulados y que sirven de complemento energético para los embriones (Ojeda & Chaparro 2004). Diferentes investigaciones han demostrado que este fluido puede contener aminoácidos, proteínas y polisacáridos disueltos (Bayne 1968; De Mahieu *et al.* 1974; Paschke 1992; Miloslavich 1999), los que representan un alto valor nutritivo potencial para los embriones. Esto ha sido reportado en especies de gastrópodos Murícidos (*Nucella lapillus*, Stöckmann-Bosbach & Althoff 1989; *Urosalpinx cinerea*, Rivest 1986), así como también en gastrópodos Calyptraeidos (*Crepidula fecunda*, Ojeda & Chaparro 2004). En ocasiones, el material orgánico disuelto (MOD) en el fluido intracapsular suele ser de origen materno, depositado directamente al momento del encapsulamiento (Miloslavich 1999; Marín *et al.* 2003; Ojeda & Chaparro 2004), en tanto que en otros casos, este aporte emanaría de la contribución de proteínas-aminoácidos provenientes de la pared capsular las que en parte se originan de la disolución mecánica o química de la capa interna de la cápsula, y que está en contacto directo con el fluido intracapsular (De Mahieu *et al.* 1974). Esta proteína disuelta se puede incorporar mediante la alimentación activa a través de la abertura oral usando la actividad ciliar del velo o por endocitosis, que se observa en las células del velo, del pedal o en el riñón larval (De Mahieu *et al.* 1974; Rivest 1992; Moran 1999). Este aporte capsular, suele causar variaciones en el peso de las ovicápsulas a medida que avanza el desarrollo embrionario, particularmente en el componente orgánico de las paredes capsulares, tal como ha sido identificado por Paschke (1992). Esta MOD puede ser utilizada como fuente nutricional durante las etapas larvianas de invertebrados marinos (Manahan & Crisp 1983; Jaeckle & Manahan 1989; Welborn & Manahan 1990; Leroy *et al.* 2012). Cuando los embriones alcanzan el estadio véliger, la concha larval o los cilios del velo podrían generar por contacto físico, micro-desprendimiento de la pared interna, debido a que ésta puede ser de consistencia esponjosa y frágil (Ojeda & Chaparro 2004), o bien, mediante la disolución producido por algún proceso de tipo bioquímico intracapsular, y que conlleva al adelgazamiento de la pared interna. La evidencia respalda la participación de las paredes capsulares como aporte nutricional al desarrollo embrionario en gastrópodos marinos con desarrollo encapsulado (De Mahieu *et al.* 1974; Ojeda &

Chaparro 2004; Bigatti *et al.* 2014). Gallardo (1980), considera que el desarrollo directo es un mecanismo reproductivo avanzado desde el punto de vista energético, especialmente en los casos donde el desarrollo embrionario se basa en la presencia de huevos nutricios. Este autor, plantea que la presencia de vitelo extraembrionario en gastrópodos Murícidos favorecería el rápido desarrollo embrionario intracapsular, reduciendo el tiempo hasta la eclosión de los juveniles y, por lo tanto, reduciendo la exposición a las presiones de mortalidad en la zona intermareal (Gallardo 1979). Un ejemplo de lo anterior es *Acanthina monodon* (Pallas 1774), gastrópodo de la familia Muricidae, que se caracteriza por presentar desarrollo larval directo, proceso que se lleva a cabo totalmente en el interior de las cápsulas. Éstas son depositadas en el intermareal rocoso, donde la madre las abandona después de la ovoposición. Esta especie es comúnmente conocida como “caracol con diente” y es abundante en el intermareal rocoso bajo y submareal somero (Osorio *et al.* 1979; Reid & Osorio 2000), distribuyéndose desde los 28° S hasta los 55° S en la costa rocosa de Chile (Gallardo 1979; Valdovinos 1999). Las cápsulas son adheridas al sustrato en estrechas agrupaciones sobre plataformas de rocas y/o cantos rodados en zonas de alta exposición al oleaje (Gallardo 1979). El desarrollo encapsulado varía entre 55 y 65 días en temperaturas de 11° y 14 °C, respectivamente (Gallardo 1979). *A. monodon* es una especie carnívora durante su fase bentónica de juvenil y adulta, pero durante el desarrollo embrionario el aporte energético depende tanto del vitelo como de los huevos nutricios disponibles en cada cápsula. También, se ha identificado la capacidad de depredar sobre sus hermanos durante el encapsulamiento. Sólo entre el 6.6 y el 7.9% de los huevos completan su desarrollo como juveniles al interior de las cápsulas (Gallardo 1979). En esta especie no se dispone de información sobre el aporte energético potencial de las paredes internas y de su relación con la materia orgánica disuelta en el líquido intracapsular ni de los cambios estructurales y bioquímicos que ello pudiera generar. Considerando lo anterior, en la presente investigación se estudian los cambios gravimétricos, morfológicos y bioquímicos de las paredes capsulares en función al avance del desarrollo encapsulado y su potencial aporte energético para los embriones a través de la incorporación de MOD en el fluido intracapsular donde se desarrollan los embriones del caracol con diente *Acanthina monodon*.

4. HIPÓTESIS

El desarrollo embrionario de *Acanthina monodon* hasta la etapa de eclosión de los juveniles, se lleva a cabo al interior de cápsulas. Durante ese periodo, la pared capsular experimenta alteraciones en su peso total, espesor de las paredes, contenido orgánico y en los niveles proteicos. Estos cambios, particularmente los sufridos por la capa interna, implican un aporte energético, principalmente en forma de proteínas, hacia el fluido intracapsular. Este aporte queda reflejado en un adelgazamiento y pérdida de materia orgánica de las paredes a medida que se avanza en el desarrollo embrionario, y se relaciona con las variaciones en el contenido proteico del fluido intracapsular y en el de los embriones encapsulados.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general.

Identificar y cuantificar los cambios morfológicos, gravimétricos y proteicos en las paredes capsulares y en los embriones a través del desarrollo encapsulado

5.2. Objetivos específicos.

1. Cuantificar las variaciones gravimétricas (peso seco total, materia orgánica, materia inorgánica) en las paredes capsulares durante el desarrollo embrionario de *A. monodon*.
2. Determinar los cambios en el espesor de las capas de las paredes capsulares a través del desarrollo embrionario.
3. Cuantificar el contenido de proteínas totales en las paredes capsulares a través del desarrollo embrionario.
4. Evaluar el potencial aporte nutricional de las capas internas de las cápsulas sobre los embriones encapsulados.
5. Cuantificar el contenido de proteínas totales del fluido intracapsular a través del desarrollo embrionario.
6. Evaluar el crecimiento y el contenido proteico total de los embriones a través del desarrollo intracapsular.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Obtención de las muestras

Cápsulas de *Acanthina monodon* (Pallas 1774) fueron obtenidas entre Enero y Marzo de 2017 desde el intermareal de la playa costera de Calfuco (39°46'50.01"S, 73°23'34.28"W), ubicada a unos 30 km de la ciudad de Valdivia, Región de los Ríos en el sur de Chile (Fig. 1). Se colectaron alrededor de 400 posturas de distintas madres. En la colecta de algunas cápsulas, se siguió el patrón de postura de las mismas, de manera de disponer de cápsulas con similares estadíos de desarrollo. Por su parte, otras cápsulas fueron colectadas de diferentes posturas, de manera de disponer de estadíos de desarrollo diferentes. Para la obtención de cápsulas durante el periodo experimental, algunos individuos adultos fueron llevados al laboratorio costero de Calfuco donde se mantuvieron con agua de mar circulante y aireación constante en estanques de 50 L. Estos animales fueron alimentados *ad libitum* con ejemplares de *Perumytilus purpuratus* tomados del mismo lugar desde donde habían sido extraídos los caracoles. Por su parte, las cápsulas obtenidas directamente del intermareal se mantuvieron en los laboratorio de la Universidad Austral de Chile en condiciones próximas a las del ambiente (temperatura: 16 ± 1 °C, salinidad: $30 \pm 1\%$) en acuarios de 6 L de agua de mar filtrada y con aireación constante. Diariamente, se hizo recambio de agua de los acuarios y limpieza de cada cápsula con pinceles para evitar el crecimiento de bacterias, hongos y/o protozoos. Las cápsulas se mantuvieron bajo estas condiciones por una semana, hasta su utilización.

Durante la identificación de los niveles de desarrollo embrionario, se diferenciaron cinco estadíos de desarrollo para todos los análisis: los dos primeros estadíos no presentaban aún desarrollada la concha (huevo y trocófora), junto a dos estadíos con presencia de concha y velo (véliger temprana, véliger avanzado), además de los juveniles pre-eclosión (Fig. 2). Para estas categorizaciones se utilizó la descripción del desarrollo encapsulado hecha por Gallardo (1979). Las velígeras iniciales midieron entre 500 a 750 μm longitud de concha, velígeras avanzadas entre 790 y 920 μm y juvenil pre-eclosión alcanzaron >1000 μm .

6.2. Análisis gravimétricos de cápsulas y embriones

Aproximadamente unas 245 cápsulas de 40 madres diferentes fueron seleccionadas. De cada cápsula, se separó la pared capsular y el contenido embrionario. Por su parte, los embriones fueron fotografiados bajo lupa usando el programa Micrometrics SE Premium 4.5.1. De los estadíos tempranos sin concha (huevo y trocófora), sólo se obtuvo el peso seco, orgánico e inorgánico y se identificaron por su nivel de desarrollo. Por su parte, desde las cápsulas con estadíos con concha desarrollada (véliger temprana, véliger avanzado y juvenil pre-eclosión) se seleccionaron 10 individuos al azar. Ellos fueron fotografiados, y se estimó la longitud de concha, obteniendo un promedio para cada cápsula. Estas mediciones fueron hechas, procesando las imágenes mediante el programa image J.

Cinco cápsulas vacías por estadío de desarrollo embrionario fueron agrupadas en placas de alusa, las que fueron previamente numeradas y pesadas. Las paredes capsulares fueron lavadas con agua destilada para eliminar sales residuales. Cada placa de alusa con su contenido, se mantuvo en la estufa por 48 h a 60 °C. Transcurrido ese tiempo, se volvió a pesar para obtener el peso seco. Posteriormente, las placas de alusa con muestras, se pusieron en una mufla por 3 h a 450 °C, de manera de quemar todo el contenido orgánico. Luego de enfriadas en un desecador, las cápsulas se pesaron para obtener el contenido de cenizas de las muestras. La fracción orgánica se obtuvo a través de la diferencia del peso seco y el peso de las cenizas.

Para obtener el peso seco por embrión, se lavó con agua destilada el conjunto de embriones de una misma cápsula, y se depositaron en un filtro previamente pesado. Se mantuvieron por 48 h a 60 °C en la estufa y se pesaron nuevamente. Para cada filtro con muestra, se estimó un peso promedio por individuo, considerando la cantidad de embriones presentes. El peso seco se asoció al estadío de desarrollo embrionario o a la longitud promedio de la concha de las velígeras.

Los valores de peso seco, orgánico e inorgánico, fueron estimados por unidad capsular al dividir la cantidad de cápsulas (todas con igual desarrollo embrionario) presentes en una placa de alusa. El mismo procedimiento se siguió para los embriones.

6.3. Análisis histológico de las paredes capsulares

Se seleccionaron 12 cápsulas por cada estadio de desarrollo (huevo, trocófora, véliger temprana, véliger avanzada y juvenil pre-eclosión) provenientes de distintas madres, para identificar el número de capas capsulares y medir el espesor respectivo. También se midió el área del tapón capsular (en vista vertical), a medida que avanzaba el desarrollo de los embriones.

El procesamiento de las muestras fue el siguiente: Las cápsulas fueron depositadas en tubos Eppendorf y fijadas con una solución de formalina al 7% con agua de mar filtrada durante 2 horas. Transcurrido ese tiempo se realizó un recambio de la formalina y las muestras se mantuvieron a 4 °C hasta su uso. Las muestras fueron procesadas de acuerdo a métodos clásicos de histología (Montuenga *et al.* 2009). Se realizaron cortes histológicos longitudinales y transversales que fueron teñidos usando hematoxilina-eosina. Posterior a la tinción, las muestras fueron observadas mediante el microscopio Olympus y se tomaron fotos con una cámara acoplada, usando el programa Q capture Pro 6.0. El análisis de las imágenes se realizó utilizando el programa image J. Empleando estas imágenes, se obtuvo el número y espesor de las capas que componían la pared capsular. El área del tapón capsular, se obtuvo para diferentes estadios de desarrollo, a partir de fotos tomadas a secciones histológicas que atravesaron verticalmente el área de hatching embrionario.

6.4. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Se seleccionaron 12 cápsulas por cada estadio de desarrollo y de ellas, se utilizaron las paredes capsulares. Las muestras fueron fijadas con glutaraldehído al 2.5% sobre hielo, durante al menos 25 minutos agitando cada cierto tiempo. El fijador se retiró mediante 4 lavados de 10 min con tampón fosfato 0.1 M, enfriado con hielo. Las muestras fueron almacenadas con buffer y mantenidas en tubos Eppendorf a 4 °C hasta su uso (Rivest 1992; Ojeda & Chaparro 2004).

Las paredes capsulares se deshidrataron en una serie de gradientes de etanol de 50% a 90% con incrementos del 10%, terminando con dos enjuagues finales en etanol al 100%. La deshidratación completa se realizó en un secador de punto crítico con CO₂ como fluido de transición. Luego, las muestras se montaron en un portaobjeto para MEB y se recubrieron con oro para su observación en el Zeiss oxford instrument x-act para MEB con una salida de imagen al PC. Varias de las imágenes representativas de cada etapa capsular se almacenaron para el posterior análisis.

6.5. Cuantificación de proteínas totales de las paredes capsulares, líquido intracapsular y embriones

De acuerdo al estadio de desarrollo de los embriones, las cápsulas fueron diseccionadas y se colectaron tanto las paredes capsulares, el líquido intracapsular y los embriones. En forma independiente, las muestras fueron depositadas en tubos Eppendorf, los cuales posteriormente fueron almacenados a -80 °C para el análisis de proteínas totales. En los casos donde las muestras fueron muy pequeñas, se agrupó material de varias cápsulas, pero que estuvieran siempre en los mismos estadios de desarrollo embrionario.

Antes de los análisis, las muestras de paredes capsulares y de los embriones fueron molidas separadamente, usando un mortero de porcelana y en presencia de nitrógeno líquido. El análisis de proteínas se realizó utilizando un kit de extracción para proteínas (Pierce BCA Protein Assay) y para ello se siguieron los protocolos del fabricante. En este caso, los embriones y las paredes capsulares fueron pre-tratadas con buffer Tris HCl pH 6.9 y sonicadas con un disruptor celular.

Una vez montada las muestras junto a los reactivos en una microplaca, se procedió a la lectura del contenido proteico utilizando un lector de microplaca Anthos zenyth 200 conectado a un PC mediante el programa ADAP.

Los valores del contenido proteico en cápsulas y en embriones fueron expresados por mg de tejido, en tanto que el fluido intracapsular fue expresado por ml.

6.6. Análisis estadístico

Con el objetivo de determinar la normalidad de los datos, se realizó una prueba de homocedasticidad de Levene y Hartley F-max. Los datos que no cumplieran con dicha normalidad, fueron transformados.

Antes de los análisis estadísticos, los datos de peso seco de las paredes capsulares se transformaron elevándolos al cubo, en tanto que el peso orgánico se transformó utilizando el inverso del log natural. Adicionalmente, los datos del contenido proteico en embriones se transformaron usando raíz cuadrada. Finalmente, el área del tapón de eclosión se transformó aplicando logaritmo natural.

Para el análisis estadístico, se utilizó una ANOVA-1 vía, seguido de una prueba a posteriori de Tukey HSD para los análisis gravimétricos, contenido de proteínas, área del tapón de eclosión y los análisis de las proyecciones de la pared externa de la cápsula a través del desarrollo embrionario. La prueba de Tukey HSD permitió detectar cuales estadios de desarrollo fueron significativamente diferentes en función de la gravimetría, los análisis histológicos y los análisis bioquímicos.

Además, se realizó una prueba t para comparar los cambios (%) en el espesor de las capas de la pared capsular con el avance del desarrollo embrionario.

En todas las pruebas se consideró un nivel de significancia del 5 % ($p < 0.05$) y para los análisis estadísticos se utilizó el programa STADISTICA versión 7.0.

7. RESULTADOS

7.1. Análisis gravimétricos: Paredes capsulares y embriones encapsulados

Los análisis de gravimetría capsular indican que el peso seco de las paredes de la cápsula de *Acanthina monodon* disminuyó significativamente con el avance del desarrollo embrionario (Fig. 3A. $F_{4,44}$; $p < 0.01$). Los valores extremos se identificaron entre el estadio inicial de huevo ($2.633 \text{ mg cápsula}^{-1}$) y el de juvenil pre-eclosión ($1.92 \text{ mg cápsula}^{-1}$). El contenido orgánico de las paredes de la cápsula también disminuyó durante el desarrollo encapsulado (Fig. 4. $F_{4,44}$; $p < 0.03$) desde estadio temprano de huevo ($2.38 \text{ mg cápsula}^{-1}$) al de juvenil pre-eclosión ($1.83 \text{ mg cápsula}^{-1}$). El contenido inorgánico por cápsula tuvo una disminución significativa (Fig. 4. $F_{4,44}$; $p < 0.002$) con el avance del desarrollo embrionario (huevo: $0.25 \text{ mg cápsula}^{-1}$; juvenil pre-eclosión: $0.09 \text{ mg cápsula}^{-1}$).

En los embriones, se evidenció un incremento significativo en el peso seco (Fig. 3B. $F_{4,39}$; $p < 0.0001$) durante el desarrollo encapsulado con valores que fueron desde $0.039 \text{ mg embrión}^{-1}$ en el estadio de huevo hasta $0.076 \text{ mg embrión}^{-1}$ en juveniles pre-eclosión.

7.2. Análisis histológicos y microscopía electrónica de barrido (MEB): Paredes capsulares, tapón de eclosión y prolongaciones capsulares

Se identificaron tres capas componiendo la pared capsular: capa interna, intermedia y externa (Fig. 5). Estas capas están presentes a través de todo el desarrollo encapsulado.

La pared externa de la cápsula es delgada y tiene un espesor que varía entre $2.3 \mu\text{m}$ y $2.1 \mu\text{m}$, desde el estadio inicial de huevo hasta el de juvenil pre-eclosión. La capa externa da origen a las prolongaciones que se proyectan desde la pared y hacia el exterior. Estas prolongaciones, están presentes en todos los estadios de desarrollo (Fig. 6), pero varían en área y longitud, disminuyendo significativamente durante el avance del desarrollo intracapsular (Fig. 7. $F_{4,24}$; $p < 0.0001$). La capa intermedia de la cápsula es la de mayor espesor en la pared capsular. El ancho total de esta capa varía entre 37

μm para estadíos tempranos de huevos y $29 \mu\text{m}$ para juveniles pre-eclosión. Se caracteriza por ser de tipo densa en los extremos de la capa, mientras que vacuolada en la región media. La sección vacuolada central ocupa aprox. el 50 al 60% del volumen de la capa. Por su parte, la tercera capa capsular, la capa interna, es delgada y su espesor varía con el desarrollo embrionario, entre $2.4 \mu\text{m}$ (huevo) y $1.5 \mu\text{m}$ (juvenil pre-eclosión). Esta última capa da origen al tapón capsular, tapón que ocupa el área de cierre de la cápsula y que se proyecta hacia el interior de la cápsula. Nuestros resultados muestran una disminución significativa (Fig. 8A, $F_{3,20}$; $p < 0.0001$) del área cubierta por el tapón, entre el estadío inicial de huevo (0.77 mm^2) y los estadíos más avanzados (véliger avanzada: $0.062 \mu\text{m}^2$; juvenil pre-eclosión: 0.01 mm^2). Solo el 2% aprox. de la superficie inicial del tapón capsular permaneció en el estadío de juvenil pre-eclosión (Fig. 8B, Fig. 9).

A cada capa identificada de la pared capsular (Fig. 10) se le determinó su espesor (μm) por estadío de desarrollo (Fig. 11A), siendo la capa intermedia mucho más amplia en espesor que las capas externa e interna. El espesor de las paredes capsulares disminuye significativamente con el avance del desarrollo embrionario respecto del estadío inicial de huevo (Fig. 11B, $p < 0.05$). La capa interna es la que pierde porcentualmente más espesor con un 35.2% aprox. (huevo: $2.38 \mu\text{m}$; juvenil pre-eclosión: $1.54 \mu\text{m}$), mientras que la intermedia pierde un 22% (huevo: $37 \mu\text{m}$; juvenil: $29 \mu\text{m}$). La capa externa, en estadío de juvenil pre-eclosión difiere significativamente de los estadíos previos (huevo, trocófora, véliger temprana y véliger avanzada) ($p < 0.03$), disminuyendo aprox. 9% su espesor respecto al estadío inicial de huevo.

7.3. Proteínas totales de las paredes capsulares, líquido intracapsular y embriones

Las paredes capsulares presentaron una disminución significativa (Fig. 12. $F_{4,32}$; $p < 0.05$) del contenido de proteínas totales entre cápsulas con estadío inicial de huevo respecto de cápsulas con juveniles pre-eclosión (huevo: $0.0056 \text{ mg prot. mg cápsula}^{-1}$; juvenil: $0.0026 \text{ mg prot. mg cápsula}^{-1}$).

El contenido promedio de proteínas en el fluido intracapsular, disminuyó significativamente (Fig. 13, $F_{4, 45}$; $p < 0.0001$) entre estadíos iniciales sin presencia de concha (huevo: 4.35 mg ml^{-1}), respecto de estadíos más avanzados (juvenil: 2.0 mg ml^{-1}). En forma paralela, las mediciones del contenido de proteínas disuelta en el agua de mar desde donde se muestrearon las cápsulas, fue significativamente más bajo ($p < 0.0001$) que los niveles registrados en el fluido intracapsular de cualquier nivel de desarrollo (Fig. 13), con valores muy cercanos a 0.

En embriones encapsulados, el contenido de proteínas totales mostró diferencias significativas (Fig. 14. $F_{4, 32}$; $p < 0.02$) a través del desarrollo intracapsular. Así por ejemplo, las proteínas totales incrementaron desde $0.000414 \text{ mg embr}^{-1}$ en el estadio de huevo hasta $0.001 \text{ mg embr}^{-1}$ en el estadio de véliger avanzada. Por su parte, el contenido de proteínas totales de los huevos nutricios, no difiere del contenido de los huevos embrionarios. Curiosamente, en el caso de véliger avanzada se identificaron los mayores promedios de proteínas totales, en tanto que el de juveniles pre-eclosión se evidenció una disminución (aunque no significativa) en los contenidos proteicos.

8. DISCUSIÓN

8.1. Análisis gravimétricos

El tiempo del desarrollo encapsulado en *A. monodon* ha sido registrado entre 55 y 65 días (Gallardo 1979). Este prolongado tiempo encapsulado, expone a las cápsulas en el intermareal a los efectos ambientales externos y a los internos (embrionarios), todo lo cual puede impactar sobre las estructuras capsulares envolventes. Una situación como esa, ha sido efectivamente identificada en nuestros resultados. Estos cambios se evidencian fuertemente en la pérdida de peso de las paredes capsulares, así como en la reducción del tamaño de las ornamentaciones y en el espesor de las paredes capsulares. En *A. monodon*, las paredes capsulares efectivamente presentaron una reducción significativa en el peso seco, perdiendo aprox. un 27.2% a través del desarrollo embrionario. Las pérdidas de peso se asocian principalmente a la disminución de la fracción orgánica de la pared capsular, de un 23.3% desde el inicio del desarrollo (huevo) y hasta juvenil pre-eclosión. Autores como De Mahieu *et al.* (1974), Paschke (1992) y Ojeda & Chaparro (2004) también registraron disminuciones en el contenido orgánico de las cápsulas con el avance del desarrollo embrionario. No se descarta que esta disolución represente una posible contribución nutricional de la pared interna (Hendler & Franz 1971; De Mahieu *et al.* 1974, Ojeda & Chaparro 2004), hacia el fluido intracapsular, el que baña a los embriones encapsulados. Nuestros resultados, también evidenciaron una reducción significativa ($p < 0.05$) del contenido inorgánico de las cápsulas. Las pérdidas de este componente capsular alcanzaron valores de hasta 64% al comparar estadio inicial de huevo con el de juvenil pre-eclosión. La disminución del contenido inorgánico de la pared a lo largo del desarrollo intracapsular, parece tener relación con la disminución de las prolongaciones de la pared externa, que decrecen en área y longitud a medida que transcurre el desarrollo embrionario. Estas prolongaciones, han perdido un 61% en área y un 48% en longitud total en la última etapa de desarrollo antes de la eclosión. Una situación como ésta, parece responder a un continuo desgaste de la pared externa (incluyendo las prolongaciones) debido a la erosión que generaría el impacto directo del oleaje sobre la cápsula, ya que ellas son normalmente depositadas por la madre en ambientes de alta exposición. No obstante,

la pérdida de contenido inorgánico capsular a través del desarrollo no es un escenario habitual para ovicápsulas, ya que hay registros donde el contenido inorgánico se mantiene constante (Ojeda & Chaparro 2004). Sin embargo, para este caso las cápsulas han tenido cuidado materno físico lo que limita la acción erosiva del oleaje, al cual se ven sometidos las cápsulas de *A. monodon*. Evidencia de abundante contenido inorgánico en cápsulas de gastrópodos ha sido identificada en especies de la familia Volutidae (ej. *Odontocymbiola magellanica* y *Alcithoe arabica*). En las hembras de estas especies se ha identificado la presencia de células especializadas (caliciformes), localizadas en el epitelio de la glándula pedal y que tienen la capacidad de secretar una fina capa de calcio para recubrir la fracción orgánica de la cápsula (Bigatti *et al.* 2010).

La pérdida de las prolongaciones capsulares de la pared externa en *A. monodon* podría generar algún nivel de problemas para los embriones encapsulados. Es sabido que las cápsulas en el intermareal se exponen a periodos de desecación, cuando las mareas bajan, quedan expuestas al aire. Es posible que estas prolongaciones pudieran retener algún nivel de agua, con lo cual se reduciría o enlentecería la pérdida de humedad desde la cápsula durante las horas de exposición y con ello un potencial efecto en los embriones. Igualmente, ésta retención de agua de mar, podría además contener algún nivel de oxígeno disuelto que podría estar disponible para los embriones, al menos durante el periodo inicial de exposición. Aspectos como los anteriores, deberían ser parte de investigaciones futuras, esto en función a que el desarrollo embrionario normal de especies encapsuladas, tiene una fuerte relación con el oxígeno disponible para el desarrollo embrionario (Brante *et al.* 2009).

En los embriones encapsulados de *A. monodon* el peso seco total aumentó (casi un 100%) significativamente con el desarrollo. Incrementos de esta magnitud también han sido descritos para embriones de otras especies de gastrópodos encapsuladores (Chaparro & Paschcke 1990; Ojeda & Chaparro 2004). El aumento en peso de los embriones de *A. monodon*, respondió inicialmente a la ingesta de los huevos nutricios que se lleva a cabo en la etapa de trocófora (Gallardo 1979). En diferentes especies de gastrópodos, los huevos nutricios representan una importante fuente de alimento exógena para los embriones encapsulados (Spight 1976; Gallardo 1977, 1979, 1980,

1981; Pechenik 1984). En *A. monodon*, el incremento en peso de los estadíos siguientes a la trocófora, parece responder al uso de materia orgánica disuelta (MOD) disponible en el fluido intracapsular y al desarrollo de la concha durante la etapa de velígera a juvenil pre-eclosión. Esta última estructura participa del aumento de peso de los embriones como ha sido registrado por diferentes investigadores (Bayne 1968; De Mahieu *et al.* 1974). Respecto al uso de MOD, en estadíos tempranos de desarrollo en prosobranquios, se han descrito casos en que ésta sería el material nutritivo más importante para los embriones en desarrollo, como por ejemplo el caso de Mesogastrópodos (Creek 1951; Demian & Yousif 1973) y en gastrópodos Stenoglossos (Rivest 1986), donde se ha registrado la ingesta de albúmina como parte de la nutrición embrionaria, además de los huevos nutricios. Nuestras observaciones en *A. monodon*, indican que cuando los embriones alcanzan el estadio véliger temprana, los huevos nutricios han sido consumidos prácticamente en su totalidad, de manera que la ingesta total de ellos ocurre previo al desarrollo de la larva velígera. Lo anterior pareciera responder a las estructuras asociadas a la ingestión. En el caso de las trocóforas de *A. monodon*, es la boca, esófago y estómago que se expanden, permitiendo el engullimiento de los huevos nutricios (Gallardo 1979), los cuales se ingieren como una unidad íntegra. Esta expansión de la boca permite la ingesta del huevo nutritivo que tiene un diámetro aprox. de 204 a 293 μm (Gallardo 1979). En el siguiente nivel de desarrollo correspondiente a véliger con concha, el desarrollo propio de la boca larval, generaría problemas anatómicos que impedirían el engullimiento de los huevos nutricios, en el caso de aún existir algunos huevos no ingeridos en el interior de las cápsulas. Esta fuente de nutrición extraembrionaria previa a la formación de la concha es de suma importancia ya que el número de huevos nutricios consumidos durante el desarrollo intracapsular determina el tamaño de eclosión en algunos prosobranquios (Spight 1976, Rivest 1983). No obstante, la real importancia de la asimilación de los huevos nutricios nunca ha sido estudiado en los embriones de *A. monodon*.

8.2. Histología y microscopía electrónica de barrido (MEB)

La pared capsular de *A. monodon* está compuesta de 3 capas, situación habitual en otras especies de la familia Muricidae (D'Asaro 1988; Rawlings 1995). Sus cápsulas están típicamente compuestas de 3 ó 4 láminas discretas: una lámina protectora externa que sella toda la cápsula incluyendo la abertura de escape, una lámina intermedia gruesa que comprende el esqueleto interno de la pared de la cápsula y está compuesta de múltiples capas fibrosas y una o dos láminas internas que encierran los embriones en desarrollo y el líquido intracapsular dentro de una cámara transparente (D'Asaro 1988; Rawlings 1995). En *A. monodon* el grosor total de la pared capsular disminuyó durante el desarrollo de los embriones, con un descenso en el espesor de la pared interna y de la intermedia (Fig. 11; $p < 0.03$). La disminución de la pared capsular interna en 35.2% por dilución, desde el estadio huevo hasta juvenil pre-eclosión, lo que hace posible que ella contribuya al contenido orgánico del fluido intracapsular que baña a los embriones, aportando proteínas o aminoácidos, situación que también ha sido identificado en otras investigaciones en especies encapsuladoras (De Mahieu *et al.* 1974; Pechenik *et al.* 1984; Chaparro & Paschke 1990; Paschke 1992; Moran 1999; Ojeda & Chaparro 2004; Brante *et al.* 2009).

La evidencia más clara de la disolución de la pared capsular en *A. monodon* corresponde al tapón de eclosión. Este tapón y la capa interna son continuidad una de la otra. En el caso del tapón, se identificó su reducción casi total (aprox. un 98%), en el momento en que la progenie encapsulada estaba en estadio de juvenil pre-eclosión. El proceso a través del cual este tapón es disuelto, no está claro, pero la evidencia en otros gastrópodos encapsuladores hace suponer una acción enzimática, que forma parte del proceso de eclosión de los embriones (Chaparro *et al.* 2012). Si bien el tapón tiene una reducción más acentuada en los estadios cercanos a la eclosión, esta disolución ocurre a través de todo el desarrollo embrionario, lo que permite suponer que el aporte de MOD desde el tapón hacia el fluido ocurriría a través del desarrollo, quedando por lo tanto MOD disponible para los embriones en crecimiento.

8.3. Cuantificación de proteínas totales

Las proteínas totales de las paredes capsulares de *A. monodon* presentaron una disminución significativa con el desarrollo embrionario en un 52.8%. Esta situación es concordante con varios autores que demostraron una pérdida del contenido proteico a lo largo del desarrollo encapsulado, por ejemplo, para el caso de *Concholepas concholepas* (Paschke 1992); *Crepidula fecunda* (Ojeda & Chaparro 2004); *Crepipatella dilatata* y *C. fecunda* (Chaparro *et al.* 2012). Estos análisis hacen evidente que las proteínas son el principal componente orgánico de las paredes que se deposita en el fluido capsular y que está disponible para ser utilizada o asimilada por los embriones durante su fase encapsulada (Hendler & Franz 1971; De Mahieu *et al.* 1974; Manahan & Crisp 1983; Jaeckle & Manahan 1989; Stöckmann-Bosbach & Althoff 1989; Welborn & Manahan 1990; Chaparro & Paschke 1990; Moran 1999; Marín *et al.* 2003; Ojeda & Chaparro 2004; Noriega & Miloslavich 2010; Chaparro *et al.* 2012).

En *A. monodon*, el contenido proteico en el líquido intracapsular disminuyó un 53.9% con el avance del desarrollo embrionario, a pesar del aporte proteico que hace la pared capsular interna. Una situación como ésta, permite asumir que los embriones estarían haciendo uso del MOD, incluso con un ritmo mayor al aporte vía disolución capsular. Las concentraciones de proteínas presentes en el fluido intracapsular de *A. monodon* resultan concordante con lo registrado para otros gastrópodos encapsuladores. Así por ejemplo, en el fluido intracapsular de *Busicon carica* y *Busicon canaliculatum*, se registraron valores de 3.8 y 8.7 mg proteína ml⁻¹ en el fluido (Harasewych 1978). El líquido intracapsular y su valor nutricional en gastrópodos encapsuladores ya había sido indicado previamente (Bayne 1968; Stöckmann-Bosbach & Althoff 1989; Calvo 1999; Penchaszadeh & Rincón 1996; Penchaszadeh & Miloslavich 2001; Ojeda & Chaparro 2004; Chaparro *et al.* 2012), por ende, el aporte energético del líquido intracapsular hacia los embriones encapsulados no es un mecanismo desconocido. La disminución continua de las proteínas en el líquido intracapsular de *A. monodon* durante el desarrollo sugiere que éstas serían adsorbidas por los embriones encapsulados (Shilling *et al.* 1996; Vavra & Manahan 1999). Se ha descrito que larvas de *Cymba gracilis* y *C. neptuni* son capaces de ingerir simultáneamente los huevos

nutricios y el líquido intracapsular (Marche-Marchad 1968). Estudios en *Nucella lapillus* han demostrado que parte del componente orgánico del fluido es incorporado por los embriones vía pinocitosis a las células integumentales de la región cefálica (Fioroni 1985). Una parte del fluido es internalizada por los denominados “riñones larvales ectodérmicos” en *Nucella lapillus*, *Buccinum undatum* (Fioroni 1985) y *Searlesia dira* (Rivest 1980). También, Rivest (1992) observó células “absorbentes” pertenecientes al complejo de los riñones larvales, células, que se encuentran en contacto directo al líquido capsular. De la exposición experimental que realizó Rivest (1980) con embriones del gastrópodo *Searlesia sira* en una solución de ferritina y albumin–fluorescein isothiocyanate conjugate (FITC) fuera de las cápsulas, queda claro que las células absorbentes adquieren rápidamente por endocitosis, las proteínas disueltas del medio y la almacenan en heterofagosomas. Estas células aumentan su volumen en el estadio de trocófora, alcanzando su máxima expansión en velígera temprana, mientras que en los estadios siguientes (velígera avanzada y-juvenil pre-closión) ocurre un proceso de reabsorción que se da lugar antes del hatching, proceso descrito también en gastrópodos como *Thais avignyi* (Eisawy & Sorial 1974) y *T. haemastoma* (Belisle & Byrd 1980). Además, Brante *et al.* (2009) demostraron en los Calyptraeídeos *Crepidula coquimbensis* y *Crepidula fornicata* la ingesta de albúmina desde el fluido intracapsular revelando presencia de fluorescencia en los embriones durante el desarrollo intracapsular. Este mecanismo que ha sido descrito en varias especies, fortalece la idea de que los embriones en desarrollo podrían utilizar la MOD desde el fluido intracapsular. En el caso particular de *A. monodon*, dicha capacidad debe ser demostrada en investigaciones futuras.

En los embriones, las proteínas totales incrementaron significativamente (148.3%) durante el desarrollo intracapsular, resultado que coincide con el aumento en el peso total de los embriones. Esta situación también se ha descrito para los embriones de *Crepidula fornicata*, que incrementaron su tamaño con el incremento de la albúmina en el líquido intracapsular (Brante *et al.* 2009). En el caso particular de los juveniles pre-eclosión de *A. monodon*, se evidenció una disminución no significativa respecto del estadio posterior al véliger avanzada. Situación que concuerda con el proceso de metamorfosis que llevan a cabo las velígeras avanzadas al interior de la cápsula, para

dar origen a un juvenil pre-eclosión. Este proceso ha sido indicado para moluscos como energéticamente costoso (Shilling *et al.* 1996; Labarta *et al.* 1999; Chaparro *et al.* 2012). La disminución del contenido proteico en juveniles metamorfoseados, antes del hatching, ha sido registrado en los gastrópodos *Buccinum cyaneum* y *Serpulorbis arenaria* (Miloslavich & Dufresne 1994; Calvo 1999). También en el Calytraeídeo *Crepipatella dilatata*, en el cual se identificó una disminución del contenido orgánico de los individuos, justo antes de la eclosión, fenómeno que ha sido asociado a altos costos energéticos producto de la metamorfosis antes de la liberación como juvenil (Chaparro & Paschke 1990; Chaparro *et al.* 2012).

En resumen, nuestros resultados evidencian que las paredes capsulares son más dinámicas de lo pensado, en términos de cambios en peso y espesor, pero también en los niveles de proteínas totales que pasan a formar parte de la materia orgánica del fluido intracapsular. Las disminuciones de las proteínas disueltas en el fluido se relacionan muy bien con el incremento en el peso embrionario, pero también con el aumento en el contenido proteico de los embriones a medida que estos se desarrollan en el interior de las cápsulas. Así, nuestros resultados permiten estimar que en *A. monondon*, la MOD en el fluido intracapsular puede constituirse en una fuente para la nutrición embrionaria, complementaria a los huevos nutricios. Sin embargo, se deberá corroborar si este aporte complementario proviene directamente de la disolución de las paredes capsulares y que tan efectivo es la asimilación por parte de los embriones.

FIGURAS

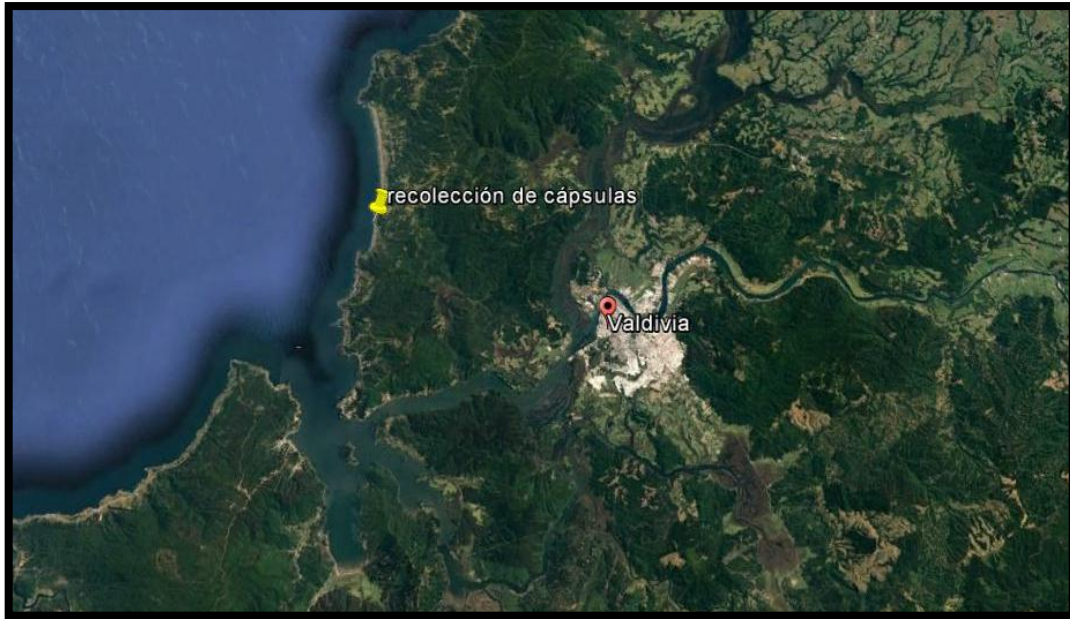


Figura 1. Lugar de obtención de las cápsulas en la playa de Calfuco, Región de Los Ríos. Fuente: google Earth.

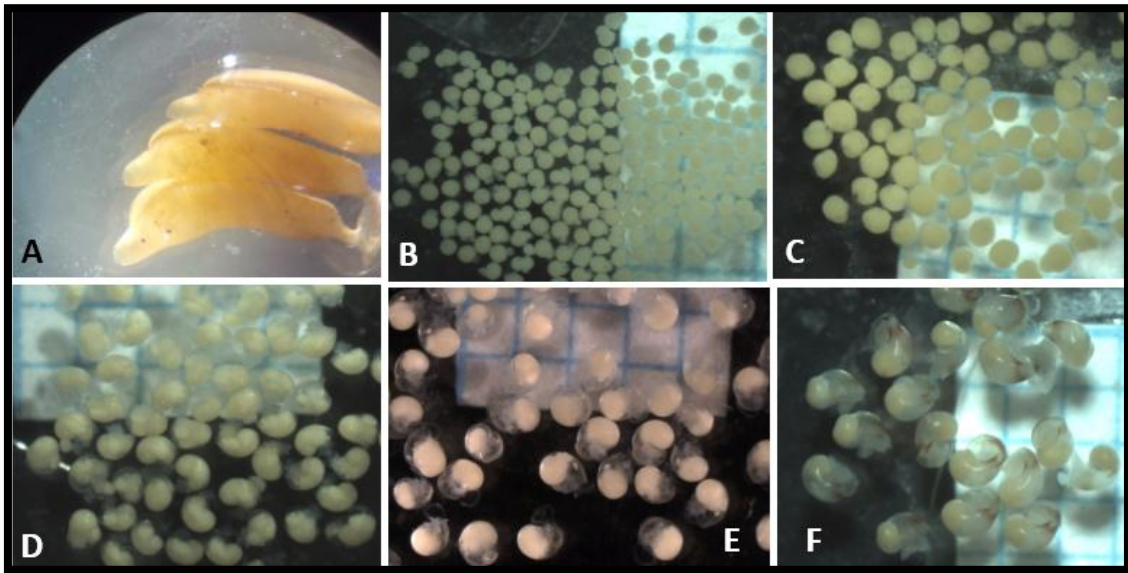


Figura 2. *A. monodon*. Cápsulas y estadios de desarrollo embrionarios usados en los experimentos. (A) Cápsulas de *A. monodon*, (B) estadio inicial o huevo, (C) estadio trocófora, (D) véliger inicial (rango tamaño long. concha: 500-750 μm), (E) véliger avanzada (rango tamaño long. concha: 790-920 μm), (F) juvenil pre-eclosión (rango tamaño long. concha: 1000-1100 μm).

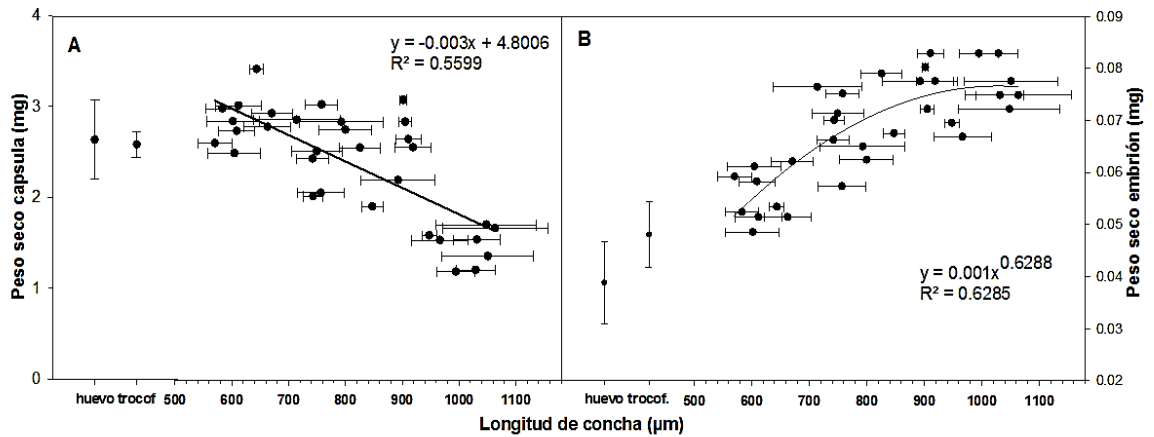


Figura 3. *A. monodon*. (A) Peso seco de las paredes de cápsulas conteniendo embriones con diferentes estadios de desarrollo, N = 50. huevo: 2.63 ± 0.43 mg (promedio \pm desv. estándar (DE)); trocófora: 2.58 ± 0.33 mg (promedio \pm DE), (B) Peso seco por embrión con diferentes niveles de desarrollo encapsulado, N = 44. huevo: 0.038 ± 0.008 mg (promedio \pm DE); trocófora: 0.048 ± 0.0063 mg (promedio \pm DE). Líneas horizontales indican rango longitud de concha. Las ecuaciones fueron estimadas usando solo la información de los estadios encapsulados que tienen concha larval desarrollada.

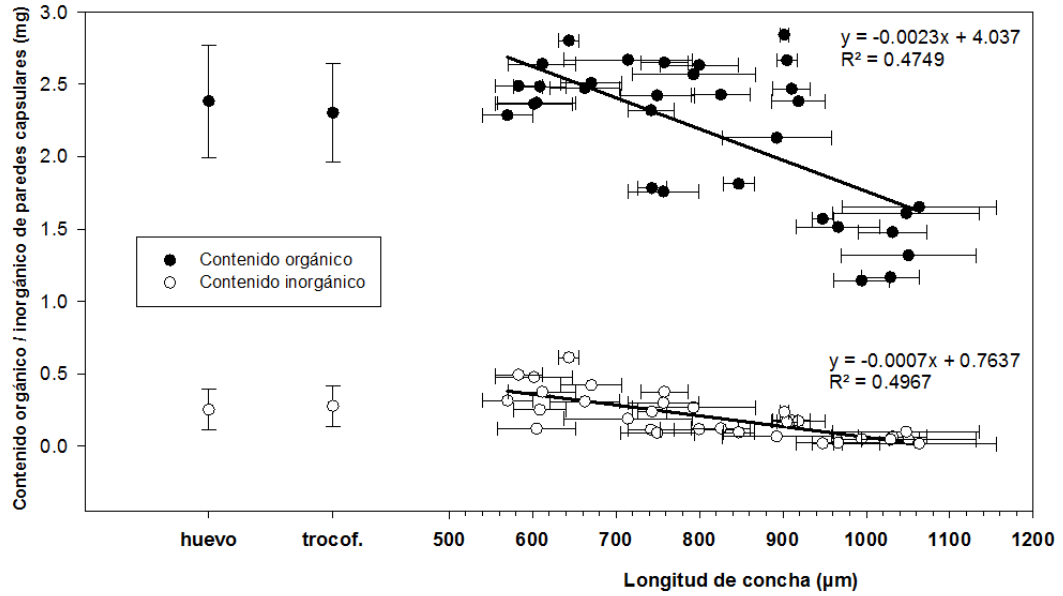


Figura 4. *A. monodon*. Peso orgánico e inorgánico de paredes de cápsulas que contenían embriones con diferentes niveles de desarrollo. N = 49. Contenido orgánico huevo: 2.38 ± 0.39 mg (promedio \pm DE); trocófora: 2.3 ± 0.34 mg (promedio \pm DE). Contenido inorgánico huevo: 0.25 ± 0.14 mg (promedio \pm DE), trocófora: 0.28 ± 0.14 mg (promedio \pm DE). Líneas horizontales indican rango longitud de concha. Las ecuaciones fueron estimadas usando solo la información de los estadios encapsulados que ya han desarrollado la concha larval.

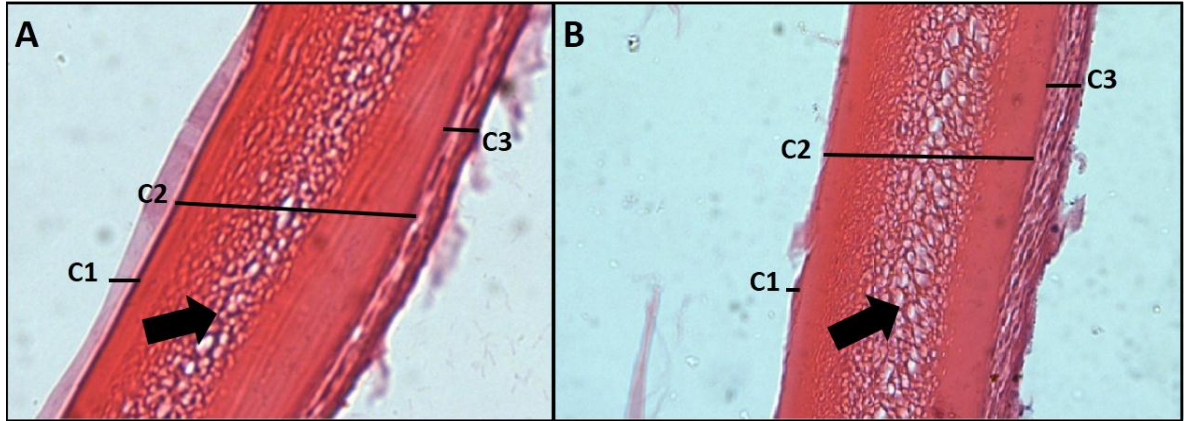


Figura 5. *A. monodon*. Secciones histológicas de la pared capsular con identificación de las capas que las conforman (A) cápsulas conteniendo estadio inicial (huevo). (B) cápsulas conteniendo estadio de juvenil pre-eclosión. C1: capa interna, C2: capa intermedia, C3: capa externa. (→): Indica el sector medio de la capa intermedia con presencia de vacuolas. Aumento de 40X.

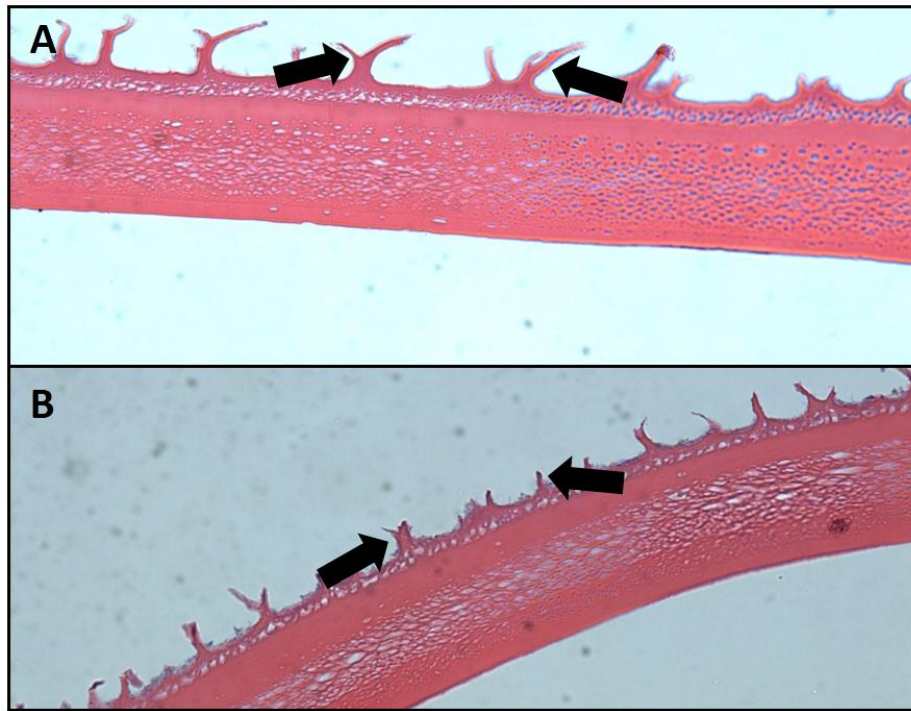


Figura 6. *A. monodon*. Secciones histológicas de cápsulas con (A) embriones en estadio huevo y (B) juveniles pre-eclosión. (→): Indican las prolongaciones de la pared externa de las cápsulas. Aumento 40X.

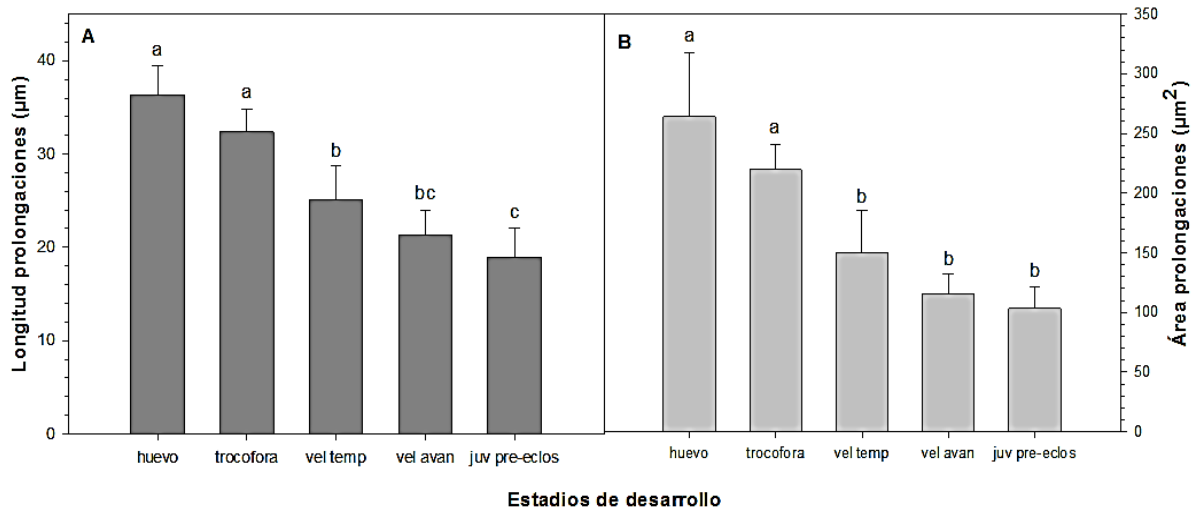


Figura 7. *A. monodon*. (A) Longitud y (B) Área (promedio \pm DE) de las prolongaciones de la capa externa de las cápsulas durante el desarrollo embrionario. N = 29. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significantes.

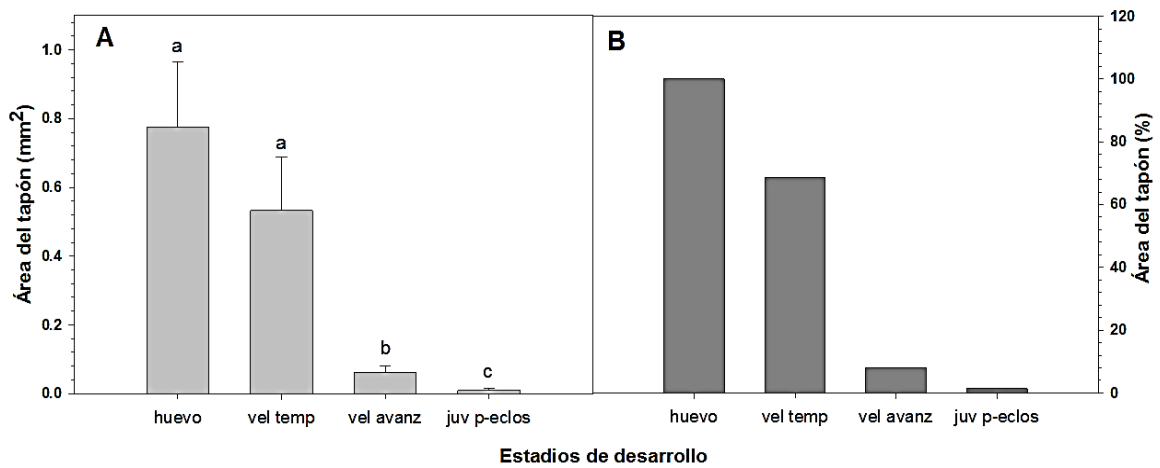


Figura 8. *A. monodon*. (A) Área del tapón de eclosión (promedio \pm DE) de acuerdo al avance del desarrollo intracapsular de los embriones. Las estimaciones del área del tapón fueron hechas a partir de secciones histológicas verticales que cruzaron en la región media del tapón. (B) Variación porcentual del área del tapón de eclosión a medida que avanza el periodo de desarrollo. Las estimaciones fueron hechas usando como referencia el área del tapón en cápsulas recién puestas. N = 24. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significantes.

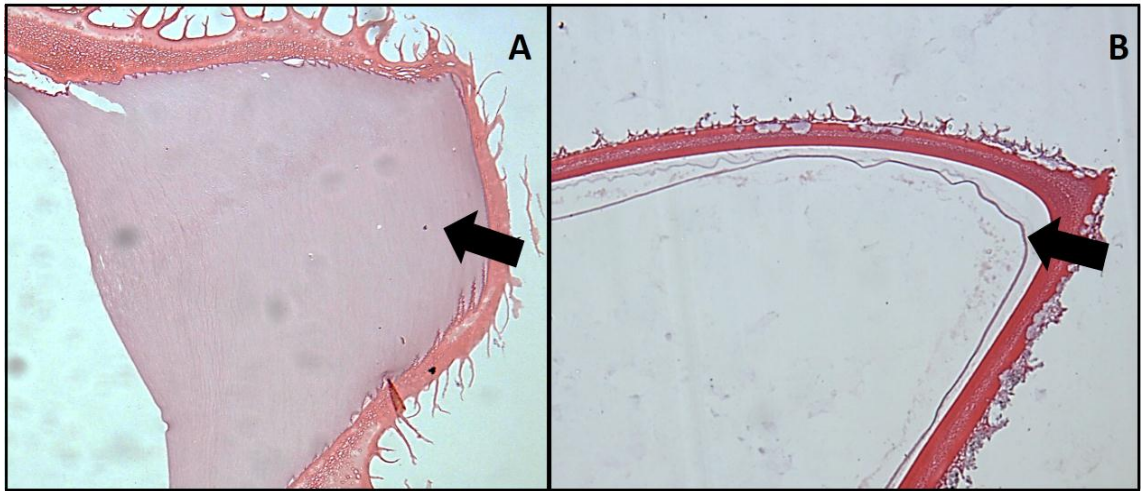


Figura 9. *A. monodon*. (A) Corte histológico en sección vertical, pasando a través de la sección media del tapón de eclosión en cápsulas con estadio inicial (huevo) y (B) en el estadio de juvenil pre-eclosión. (→): Indica el tapón capsular. Aumento de 10X

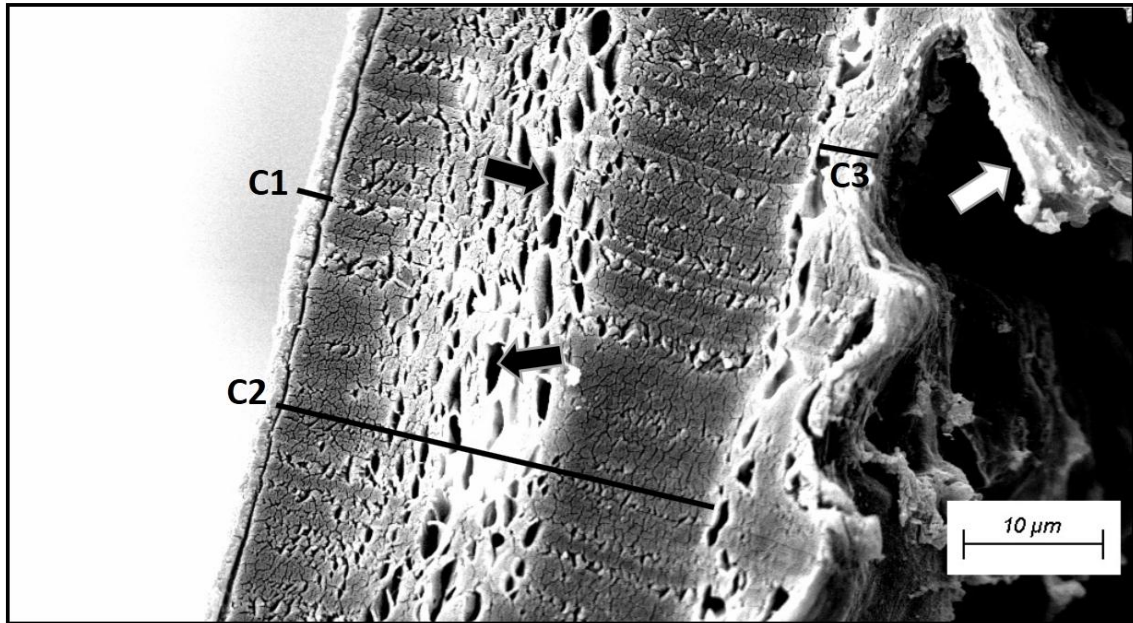


Figura 10. *A. monodon*. Espesor de la pared capsular obtenidas con microscopía electrónica de barrido en estadio de huevo. C1: Corresponde a la pared interna, C2: Pared intermedia y C3: pared externa. (→ Negra): Indican las vacuolas en la zona media de la capa intermedia, (→ Blanca): Prolongación de la pared externa.

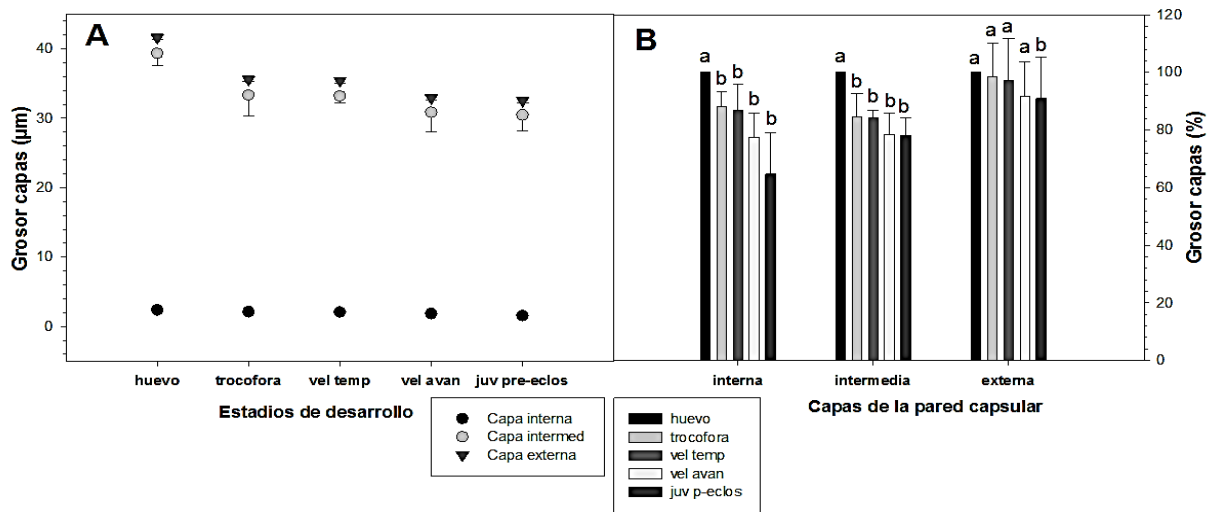


Figura 11. *A. monodon*. (A) Espesor de cada una de las capas de la pared (promedio \pm DE) en cápsulas con diferentes estadios de desarrollo embrionario. (B) Cambios porcentuales en el espesor de las capas interna, intermedia y externa en cápsulas conteniendo distintos niveles de desarrollo embrionario. N = 14. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significantes.

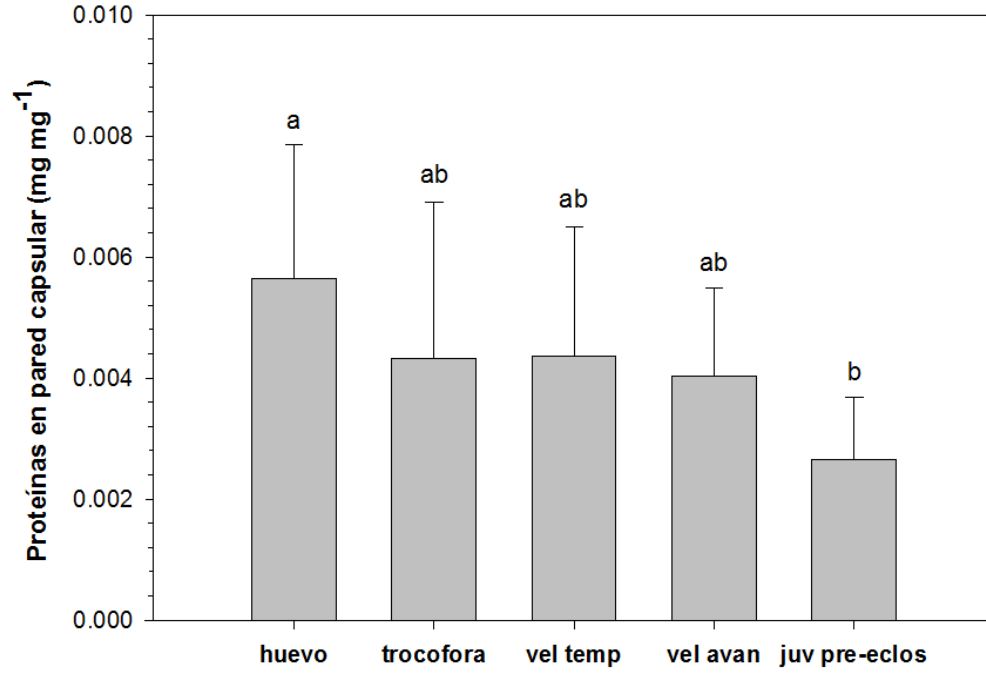


Figura 12. *A. monodon*. Proteínas totales (promedio \pm DE) en las paredes capsulares con el avance del desarrollo embrionario. N = 37. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significantes.

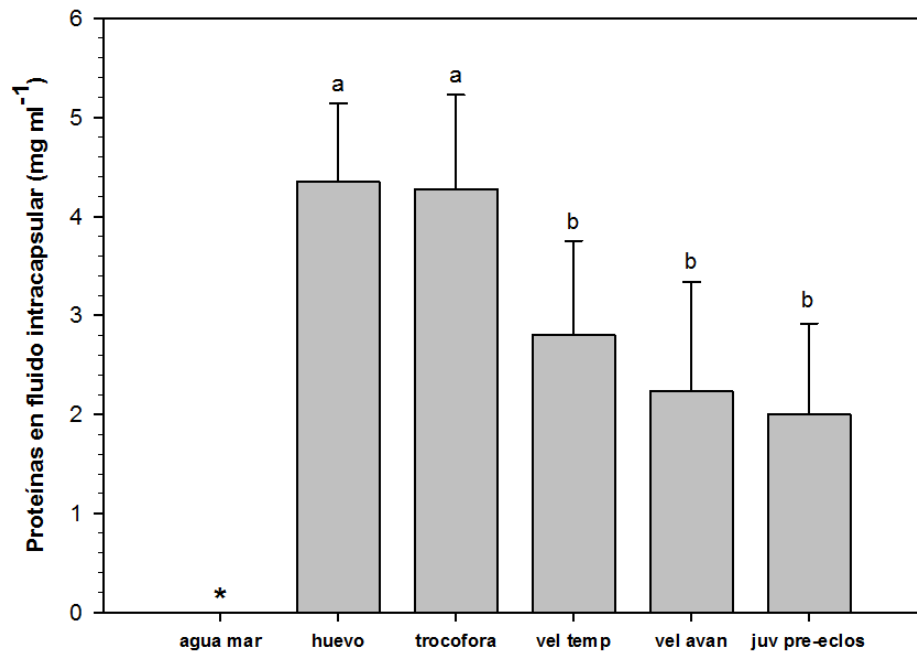


Figura 13. *A. monodon*. Proteínas totales (promedio \pm DE) en el líquido intracapsular de cápsulas con diferentes niveles de desarrollo embrionario y proteínas totales en el agua de mar. N = 50. (*) = valores cercanos a cero. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significantes.

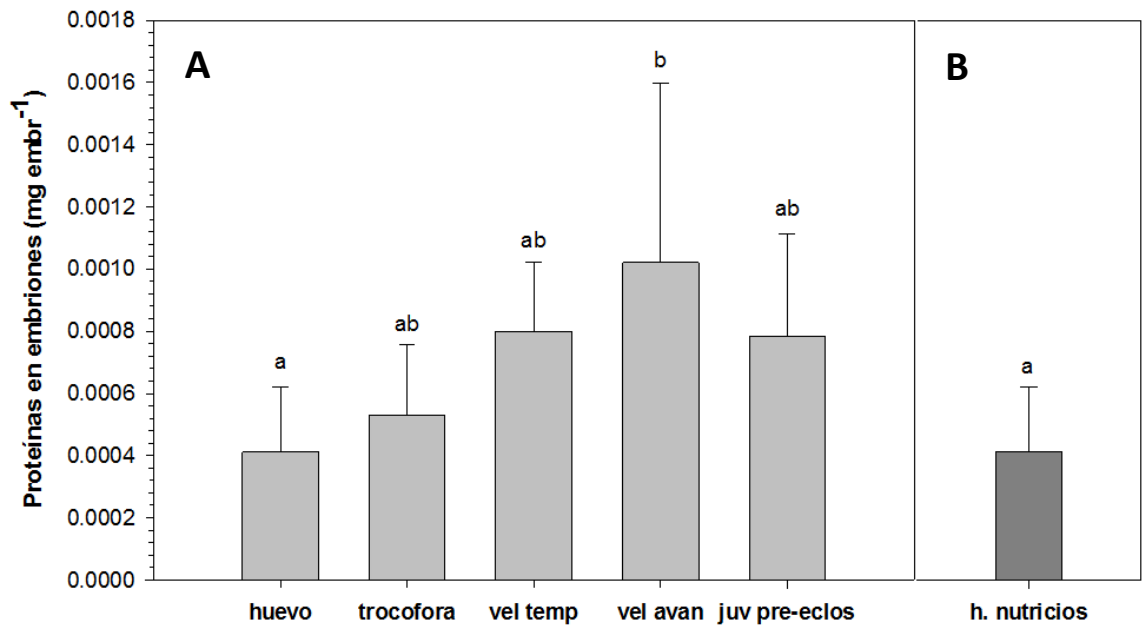


Figura 14. *A. monodon*. A) Proteínas totales por embrión (promedio \pm DE), de acuerdo al nivel de desarrollo. B) Proteínas totales en huevos nutricios (promedio \pm DE). N = 37. Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significantes.

9. CONCLUSIONES

Se evidencia disminución en espesor de las paredes capsulares, principalmente en la capa intermedia e interna, además de una disolución paulatina del tapón de eclosión.

Existe una reducción del contenido inorgánico, del contenido orgánico y del nivel proteico de las cápsulas a medida que avanza el desarrollo embrionario

Existe una disminución del contenido proteico en el líquido intracapsular a medida que avanza el desarrollo embrionario

Se registra un aumento en el peso seco y en el nivel proteico de los embriones durante el desarrollo intracapsular

La materia orgánica disuelta (principalmente proteínas) emigra desde las paredes capsulares hacia el fluido intracapsular, siendo una potencial fuente nutricional disponible para los embriones. Este aporte sería complementario a los huevos nutricios depositados naturalmente en las cápsulas.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Bayne CJ** (1968) Histochemical studies on the egg capsules of eight gastropod molluscs. *Proc Malacol Soc Lond* 38:199–212
- Belisle BW**, Byrd W (1980) In vitro egg activation and maturation, and ultrastructural analysis of development in the marine prosobranch, *Thaish aemastoma*. *Trans Am Microsc Soc* 99: 111–127
- Bigatti G**, Giraud-Billoud M, Vega I, Penchaszadeh P, Castro-Vasquez A (2010) The calcareous egg capsule of the patagonian neogastropod *Odontocymbiola magellanica*: morphology, secretion and mineralogy. *Mollus Stud* 76: 279–288.
- Bigatti G**, Giraud-Billoud M, Vega I, Penchaszadeh P, Castro-Vazquez A (2014) Embryonic development in the Patagonian red snail *Odontocymbiola magellanica* (Neogastropoda: Volutidae): Morphol Biochem. *JCZ* 253: 372–381
- Brante A**, Fernández M, Viard F (2009) Limiting factors to encapsulation: the combined effects of dissolved protein and oxygen availability on embryonic growth and survival of species with contrasting feeding strategies. *J Exp Biol* 212: 2287-2295
- Calvo M** (1999) Biología reproductiva de tres especies de la familia Vermetidae (Mollusca: Gastropoda) de las costas Mediterráneas de la Península Ibérica. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, España.
- Chaparro OR**, Paschke KA (1990) Nurse egg feeding and energy balance in embryos of *Crepidula dilatata* (Gastropoda: Calyptraeidae) during intracapsular development. *Mar Ecol Prog Ser* 65:183–191

- Chaparro OR**, Flores ML (2002) Reproductive output of *Crepidula fecunda* females: distribution of energy in the production of gametes and capsular walls. J. NZ Mar Freshw Res 36: 661–673
- Chaparro OR**, Matus PR, Thompson RJ, Segura CJ, Pardo LM, Cubillos VM (2008) Gametic, morphometric, and physiological variables influencing clutch size in the Chilean oyster, *Ostrea chilensis* (Philippi, 1845). J. Exp Mar Biol Ecol 359:18–25
- Chaparro OR**, Schmidt AJ, Pardo LM, Andrade PV, Wagner CE, Cubillos VM (2011) Reproductive strategy of the semelparous clam *Gaimardia bahamondei* (Bivalvia, Gaimardiidae). Inv Biol 130:49–59
- Chaparro OR**, Lincoqueo LA, Schmidt AJ, Veliz D, Pechenik JA (2012) Comparing biochemical changes and energetic costs in gastropods with different developmental modes: *Crepidatella dilatata* and *C. fecunda*. Mar Biol 159:45–56
- Chapmann G** (1965) The egg cocoons of *Scoloplos armiger* Müller. Biol Bull (Woods hole) 128: 189
- Collin R** (2003) Worldwide patterns in mode of development in calyptraeid gastropods. Mar Ecol Prog Ser 247:103–122
- Cubillos VM**, Chaparro OR, Montiel YA, Véliz D (2007) Unusual source of food: impact of dead siblings on encapsulated embryo development of *Crepidatella fecunda* (Gastropoda: Calyptraeidae). Mar Freshw Res 58:1152–1161
- Creek GA** (1951) The reproductive system and embryology of the snail *Pomatias elegans* (Müller) Proc Zool Soc Lond 121: 599–640
- D' Asaro CN** (1988) Micromorphology of neogastropod egg capsules. Nautilus 102: 134–148.
- De Mahieu GC**, Penchaszadeh PE, Casal AB (1974) Algunos aspectos de las variaciones de proteínas y aminoácidos libres totales del líquido intracapsular

- en relación al desarrollo embrionario en *Adelomelon brasiliiana* (Lamarck, 1811) (Gastropoda, Prosobranchia, Volutidae). Cah Biol Mar 15:215–227
- Demian ES**, Yousif F (1973) Embryonic development and organogenesis in the snail *Marisa cornuarietis* (Mesogastropoda: Ampullariidae). I. General outlines of development. Malacol 12: 123–150.
- Eisawy AM**, Sorial AE (1974) Egg capsules and development of *Thais savignyi* Deshayes. Bull Inst Oceanogr Fish Cairo 4: 237–258
- Fioroni P** (1985) Struktur und Funktion der larvalen zellen des Cephalopodiums bei jungen intrakapsulären larven von *Nucella lapillus* (Gastropoda, Prosobranchia). Zool. Beitr. N.F 29: 103–117
- Fretter V**, Graham A (1994) British prosobranch molluscs. Their functional anatomy and ecology. Ray Society, London. 740–814
- Gallardo CS** (1977) *Crepidula philippiana* n. sp, nuevo gastrópodo Calyptraeidae de Chile con especial referencia a l patrón de desarrollo. Stud Neotrop Fauna Environ 12: 177–185
- Gallardo CS** (1979) Developmental pattern and adaptations for reproduction in *Nucella crassilabrum* and other muricacean gastropods. Biol Bull Mar biol Lab, Woods Hole 157: 453–463
- Gallardo CS** (1980) Adaptaciones reproductivas en gastrópodos muricáceos de Chile: conocimiento actual y perspectivas. Inv Mar, Valparaíso 8: 115–128
- Gallardo GS** (1981) Posturas y estadio de eclosión del gastrópodo muricidae *Chorus giganteus* (Lesson, 1829). Stud Neotrop Fauna Environ 16: 35–44
- Gallardo CS**, Garrido O (1987) Nutritive egg formation in the marine snails *Crepidula dilatata* and *Nucella crassilabrum*. Int J Invert Reprod Dev 11: 239–254
- Gibbs PE** (1968) Observations on the population of *Scoloplos armiger* at Whitstable J Mar Biol Ass UK 48: 225–254

- Harasewych MG** (1978) Biochemical studies of the hatching process in *Busycon* (Doctoral dissertation, University of Delaware)
- Hendler G**, Franz DR (1971) Population dynamics and life history of *Crepidula convexa* Say (Gastropoda: Prosobranchia) in the Delaware Bay. Biol Bull 141: 514–526
- Jaeckle WB**, Manahan DT (1989) Feeding by a “nonfeeding” larva: uptake of dissolved amino acids from seawater by lecithotrophic larvae of the gastropod *Haliotis rufescens*. Mar Biol 103:87–94
- Labarta U**, Fernandez-Reiriz MJ, Perez-Camacho A (1999) Energy, biochemical substrates and growth in the larval development, metamorphosis and postlarvae of *Ostrea edulis* (L.). J Exp Mar Biol Ecol 238: 225–242
- Leroy F**, Thierry C, Brante A, Leroux C, Riera P (2012) Can encapsulated embryos of *Crepidula fornicata* (L.) use extracapsular dissolved organic matter? An experimental study with a ¹³C-enriched amino acid. J Moll Stud 78: 100–104
- Lord A** (1986) Are the contents of egg capsules of the marine gastropod *Nucella lapillus* (L.) axenic? Am Malacol Bull 4:201–203
- Manahan DT**, Crisp DJ (1983) Autoradiographic studies on the uptake of dissolved amino acids from sea water by bivalve larvae. J Mar Biol Assoc UK 63:673–682
- Marche-Marchad I** (1968) Remarques sur le développement chez les *Cymba* (Prosobranches Volutidés) et l'hypothèse de leur origine sud-américaine. Bull Inst fr. Afr noire 30 (Ser. A): 1028–1037
- Marín MG**, Moschino V, Deppieri M, Lucchetta L (2003) Variations in gross biochemical composition, energy value and condition index of *T. philippinarum* from the Lagoon of Venice. Aquaculture 219: 859–871
- Miloslavich P**, Dufresne L (1994) Development and effect of female size on egg and juvenile production in the neogastropod *Buccinum cyaneum* from the

- Saguenay Fjord. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 51: 2866-2872.
- Miloslavich P** (1999) Nutritional value of the intracapsular liquid of *Engoniophos uncinatus* Say, 1825 (Caenogastropoda: Buccinidae). J Moll Stud 65: 502–503
- Montuenga L**, Esteban FJ, Calvo A (2009). Técnicas en histología y biología celular. 1^{era} ed. Elsevier, Barcelona.
- Moran AL** (1999) Intracapsular feeding by embryos of the gastropod genus *Littorina*. Biol Bull 196:229–244
- Moran AL**, Emlet RB (2001) Offspring size and performance in variable environments: field studies on a marine snail. Ecology 82: 1597–1612
- Noriega N**, Miloslavich P (2010) Embryonic development and protein content of the embryos and intracapsular liquid of *Melongena melongena* (Caenogastropoda: Melongenidae). J Mar Biol Assoc UK 90: 347–351
- Ojeda JA**, Chaparro OR (2004) Morphological, gravimetric, and biochemical changes in *Crepidula fecunda* (Gastropoda: Calyptraeidae) egg capsule walls during embryonic development. Mar Biol 144:263–269
- Osorio C**, Atria J, Mann S (1979) Moluscos marinos de importancia económica en Chile. Biol Pesquera 11: 3–47
- Oyarzun F**, Brante A (2014). The effects of nurse eggs and sibling interactions on the larval development of the poecilogonous annelid *Boccardia proboscidea* (Spionidae). Inv Biol 133: 340–353
- Paschke KA** (1992) Fisiología, energética y composición bioquímica de *Concholepas concholepas* (Bruguiere, 1789) (Gastropoda: Muricidae) durante el desarrollo intracapsular. Tesis, Esc. de Biología Marina, Fac. Ciencias, Univ. Austral de Chile
- Pechenik JA** (1979) Role of encapsulation in invertebrate life histories. Am Nat 114:859–870

- Pechenik JA** (1982) Ability of some gastropod egg capsules to protect against low-salinity stress. *J Exp Mar Biol Ecol* 63:195–208
- Pechenik JA** (1983) Egg capsules of *Nucella lapillus* (L.) protect against low-salinity stress. *J Exp Mar Biol Ecol* 71:165–179
- Pechenik JA, Chang SC, Lord A** (1984) Encapsulated development of the marine prosobranch gastropod *Nucella lapillus*. *Mar Biol* 78:223–229
- Pechenik JA** (1986) The encapsulation of eggs and embryos by molluscs: an overview. *Am Malac Bull* 4: 165–172
- Penhaszadeh PE, Rincón A** (1996) Egg capsules and development of *Prunum prunum* (Gmelin, 1791) (Prosobranchia: Marginellidae) from the Venezuelan Caribbean. *J. Vel* 39: 83–86
- Penhaszadeh PE, Miloslavich P** (2001) Embryonic stages and feeding substances of the South American volutid *Voluta musica* (Caenogastropoda) during intracapsular development. *Am Malac Bull* 16: 21–31
- Rawlings TA** (1995) Direct observation of encapsulated development in muricid gastropods. *J. Vel* 38: 54–60
- Rawlings TA** (1996) Shields against ultraviolet radiation: an additional protective role for the egg capsules of benthic marine gastropods. *Mar Ecol Prog Ser* 136:81–95
- Reid DG, Osorio C** (2000) The shallow-water marine mollusca of the Estero Elefantes and Laguna San Rafael, southern Chile. *Bull Nat Hist (Mus of London) (Zoology)* 66: 109–146
- Rivest BR** (1980) Larval kidneys in marine prosobranch embryos: specialized structures for the uptake of egg capsule albumen. *Am Zool* 20: 905
- Rivest BR** (1983) Development and the influence of nurse egg allotment on hatching size in *Searlesia dira* (Reeve, 1846) (Prosobranchia, Buccinidae). *J Exp Mar Biol Ecol* 69: 217–241

- Rivest BR** (1986) Extra-embryonic nutrition in the prosobranch gastropod *Urosalpinx cinerea* (Say, 1822). *Bull Mar Sci* 39: 498–505
- Rivest BR** (1992) Studies on the structure and function of the larval kidney complex of Prosobranch gastropods. *Biol Bull* 182: 305–323
- Scheltema RS** (1986) On dispersal and planktonic larvae of benthic invertebrates: an eclectic overview and summary of problems. *Bull Mar Sci* 39:290–322
- Shilling F**, Hoegh-guldberg O, Manahan D (1996) Sources of energy for increased metabolic demand during metamorphosis of abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca). *Biol Bull* 191: 402–411
- Spight TM** (1976) Hatching size and the distribution of nurse eggs among prosobranch embryos. *Biol Bull Mar Biol Lab, Woods Hole* 150: 491–499
- Stöckmann-Bosbach R** (1988) Early stages of the encapsulated development of *Nucella lapillus* L. (Gastropoda, Muricidae). *J Moll Stud* 54: 181–196
- Stöckmann-Bosbach R**, Althoff J (1989) A correlated morphological and biochemical study of capsular fluid of *Nucella lapillus* (Gastropoda: Prosobranchia: Muricidae). *Mar Biol* 102: 283–289
- Thorson G** (1950) Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biol Rev* 25: 1–45
- Valdovinos CR** (1999) Biodiversidad de moluscos chilenos: base de datos taxonómica y distribucional. *Gay Zool (Chile)* 63: 59–112
- Vance RR** (1973) On reproductive strategies in marine benthic invertebrates. *Am Nat* 107:339–352
- Vasconcelos P**, Gaspar MB, Joaquim S, Matias D, Castro M (2004) Spawning of *Hexaplex (Trunculariopsis) trunculus* (Gastropoda: Muricidae) in the laboratory: description of spawning behavior, egg masses, embryonic development, hatchling and juvenile growth rates. *Invert Reprod Develop* 46: 125–138

Vavra J, Manahan DT (1999) Protein metabolism in lecithotrophic larvae
(Gastropoda: *Haliotis rufescens*). Biol Bull 2: 177–186

Welborn JR, Manahan DT (1990) Direct measurements of sugar uptake from seawater
into molluscan larvae. Mar Ecol Prog Ser 65:233–239