

ESTUDIO FUNCIONAL DE LA GLANDULA DE LEIBLEIN
DE *CONCHOLEPAS CONCHOLEPAS* (BRUGUIERE, 1789)
(GASTROPODA, MURICIDAE)

Functional study of Leiblein's gland in *Concholepas concholepas*
(Bruguiere, 1789) (Gastropoda, Muricidae)

OSCAR PONCE P.*, ALICIA MAGAÑA A.*, LETICIA SÁNCHEZ O.* Y SILVIA ENRÍQUEZ V.*

RESUMEN

Se describe por fraccionamiento subcelular la extracción de una actividad proteolítica ácida en la fracción soluble del tejido de la glándula de Leiblein de *Concholepas concholepas*. Esta proteasa presenta una actividad óptima a pH 3.5, tiene como sustrato preferencial a la hemoglobina de bovino, es inhibida por exceso de este sustrato, presenta un Km de 4.35 mg/ml y su peso molecular se ha estimado en 35.400. Presenta, además, características similares a catepsina D por cuanto es inhibida por p-hidroximercuribenzoato y monoyodo acetato, a la vez que es activada por cisteína, glutatión y dithiothreitol.

Se postula que esta enzima tendría un importante rol en la digestión proteolítica de este molusco carnívoro. Esta digestión se realizaría en el esófago posterior, preparándose la dieta proteica para su transformación definitiva a nivel del estómago y la glándula digestiva.

ABSTRACT

An acid proteolytic activity by subcellular fractioning in the soluble fraction of tissue of the Leiblein's gland of *Concholepas concholepas* is described.

This proteinase activity shows an optimum at pH 3.5, it has bovine hemoglobin as a preferred substrate; it is inhibited by an excess of this substrate; it shows a Km of 4.35 mg/ml and a molecular weight close to 35,400.

It is inhibited by p-hydroxymercurybenzoate and moniodo acetate and activated by cysteine, glutathione and dithiothreitol, which suggests it to have characteristics similar to cathepsin D.

It is claimed that this enzyme has an important role in the proteolytic digestion of this carnivorous mollusk. This digestion would take place in the posterior esophagus of the specimen; the proteic diet would be prepared for its final transformation at the level of the stomach and the digestive gland.

KEYWORDS: Mollusca. Muricidae. *Concholepas*. Chile. Leiblein gland. Acid proteinase.

*Proyecto 20.31.26. Dirección de Investigación. Departamento de Biología Molecular. Facultad de Ciencias Biológicas y de Recursos Naturales. Casilla 2407. Universidad de Concepción. Chile.

INTRODUCCION

El molusco *Concholepas concholepas* presenta dos características importantes: por un lado su hábitat es la costa del Pacífico desde Callao (12° sur) hasta Cabo de Hornos y, por otro lado, es la única especie viviente en su género, puesto que las demás se han extinguido. Alveal (1986: 1); Sed (1983: 1); Stuardo (1979: 5).

Las investigaciones realizadas en *Concholepas concholepas* se refieren fundamentalmente a aspectos taxonómicos, Stuardo (1979: 5); conductuales, Castilla et al. (1979: 99); histológicos, Maldonado et al. (1965: 121); anatómicos, Huaquín (1966: 1) y bioquímicos desde el punto de vista del metabolismo hidrocarbonado, León et al. (1982: 65), Carvajal et al. (1987: 14), no existiendo en esta especie estudios bioquímicos ni fisiológicos en relación al proceso digestivo.

El aparato digestivo de *Concholepas concholepas* ha sido muy bien descrito y en relación a él se menciona la glándula de Leiblein como asociada al esófago. Estudios realizados por Laura Huaquín (1966: 1), referidos a la anatomía de este molusco, describen su aparato digestivo formado de la siguiente forma: boca, cavidad bucal, proboscis, esófago, estómago, intestino, recto y ano. Además las glándulas anexas salivales, glándulas Framboisée, glándula de Leiblein, glándula digestiva y glándula rectal. La glándula de Leiblein es una voluminosa estructura cónica que recorre el lumen de la cavidad hemocélica anterior, arrollada en espiral alrededor de la aorta y el esófago. Esta glándula presenta un conducto que desemboca en el esófago medio. Franc (1968: 109) indica que tendría una posible función en la secreción de sustancias lubricantes que favorecerían la función digestiva y repelentes para la defensa. Para los distintos ejemplares de moluscos donde se ha descrito esta glándula se afirma que habría una relación entre su tamaño y la edad biológica del ejemplar. Stuardo (1979: 5).

Esta glándula ha sido descrita también para otras especies de moluscos, pero su función en el proceso digestivo no está del todo clara. Así Ward (1965: 447), al hacer un estudio histológico de la glándula, indica en el citoplasma celular la presencia de gránulos de secreción que corresponderían a mucopolisacáridos. Según este

autor esta glándula secretaría también una proteasa.

Hemos creído de interés realizar un estudio funcional de esta glándula con el objeto de ver su participación en la digestión proteolítica, dado que esta especie se ha descrito como un caracol eminentemente carnívoro, Castilla et al. (1979: 99), por lo que el objetivo de este trabajo es aislar y caracterizar una actividad proteolítica a pH ácido de esta glándula.

MATERIALES Y METODOS

a) Materiales empleados:

Material biológico

Los ejemplares de *Concholepas concholepas* fueron recolectados por buceo directo en la Bahía de San Vicente, Chile (36° 44' L.S.; 37° 0.8' L.W.) y mantenidos en agua de mar filtrada a 18-20°C con aireación permanente. Las glándulas de Leiblein fueron extraídas de los ejemplares y se ocuparon íntegramente para las preparaciones enzimáticas.

Reactivos químicos

Los siguientes reactivos fueron utilizados: hemoglobina de bovino tipo II, seroalbúmina de bovino tipo III, ADP disódico, NADH, ovoalbúmina, glicina, arginina, cisteína, 2-mercaptoetanol, monoyodo acetato, dithiothreitol, Sephadex G200-120, pepsinógeno de cerdo y azul dextrano de Sigma Chemical Company y glutation, HgCl₂, KCl, Tris, sacarosa, EDTA, HCl, MgSO₄, piruvato de sodio, fosfato de potasio, ácido cítrico, citrato de sodio, fosfato de sodio, hidróxido de sodio, p-nitrofenilfosfato de Na, NaCl, ZnCl₂, CaCl₂, KCN, urea, MgCl₂, Pb(NO₃)₂ y caseína de Merck.

b) Metodología:

Fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento subcelular se efectuó según el procedimiento de Appelmans con modifi-

caciones. Appelmans et al. (1955: 438).

Glándulas de Leiblein finalmente picadas fueron mezcladas en una relación 1:10 P/V con tampón Tris-HCl 5 mM pH 7.0, sacarosa 0.25 M, EDTA 1 mM, homogeneizadas y centrifugadas a 30 x g por 10 min, obteniéndose un sobrenadante inicial (SN-I). Este sobrenadante, al que se le registra la proteína y la actividad total, se centrifuga a 270 x g por 10 min obteniéndose un segundo sobrenadante (SN-II) y un pellet que se resuspendió en el mismo buffer y se centrifugó a 252 x g por 10 min. El sobrenadante se agrega a SN-II. El procedimiento de resuspensión se repite una vez más obteniéndose un pellet que corresponde a la fracción nuclear (N). SN-II se centrifugó a 13.300 x g por 10 min obteniéndose un sobrenadante denominado SN-III y un pellet que se suspendió en el mismo buffer y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El sobrenadante se integró a SN-III y el pellet resultante se denominó M, que corresponde a la fracción mitocondrial. SN-III se centrifugó a 27.000 x g por 10 min obteniéndose un sobrenadante denominado SN-IV y un pellet que corresponde a la fracción lisosomal (L). SN-IV se centrifugó a 105.000 x g por 60 min obteniéndose una fracción microsomal o pellet (P) y una fracción soluble (S). Esta última fracción y los pellet anteriores resuspendidos en tampón se congelaron y descongelaron 3 veces y posteriormente se sonicaron por 30 seg en un equipo Schoelle & Co. Frankfurt am Main-Süd TG 250 a 20.000 ciclos/seg.

Determinación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry et al. (1951: 265) utilizando seroalbúmina de bovino como estándar. La concentración de proteínas se determinó también espectrofotométricamente a 280 nm. La absorbancia de 1 mg/ml de pepsinógeno de cerdo fue determinada experimentalmente y corresponde a 1.53.

Actividad proteolítica

La actividad preolítica se determinó por el método de Anson modificado. Anson (1938: 79).

La mezcla de incubación contenía 1 ml de hemoglobina 2.4%, urea 1.5 M acidificada con HCl a pH 3.5 y la enzima en 1 ml de tampón citrato 0.25 M pH 3.5. Esta mezcla se incubó a 45°C, por cuanto fue determinada previamente como temperatura óptima de acción de la actividad enzimática. Luego de 30 min se agregó 2.5 ml de ácido tricloroacético al 10%. El filtrado de la mezcla resultante conteniendo los péptidos solubles se mide a 280 nm. El valor de la densidad óptica luego de restar la medida del tiempo cero se utilizó como medida de proteólisis. Una unidad de enzima fue definida como la cantidad de enzima que produce un incremento de 0.01 a 280 nm en 30 min a pH 3.5 y a 45°C.

Determinación de actividad de octopina deshidrogenasa

La actividad de octopina deshidrogenasa como marcador de la fracción citosólica se determinó por el método de Carvajal et al. (1987: 14).

Determinación de actividad de fosfatasa ácida

La actividad de fosfatasa ácida como marcador de la fracción lisosomal se determinó por el método de Walter y Schütt (1974: 856). Las mezclas de incubación conteniendo las fracciones separadas se incubaron con p-nitrofenilfosfato de sodio como sustrato y tampón citrato pH 5.6. Luego de 5 min de incubación, la reacción se detiene con hidróxido de sodio 0.5 N determinándose en la mezcla el fosfato liberado. La actividad relacionada con la cantidad de proteínas se expresa como actividad específica.

Determinación de pesos moleculares por el método de filtración en gel

La determinación se realizó por el método de Andrews (1964: 223). Se utilizó una columna de Sephadex G200 equilibrada con tampón acetato de Na-ácido acético 50 mM pH 5.6 a 4°C. Las muestras fueron aplicadas en un volumen de 3 ml y las fracciones colectadas fueron de 2 ml. Azul dextrano fue utilizado como marcador de

volumen de vacío y seroalbúmina de bovino, pepsina de cerdo y citocromo C fueron utilizados como marcadores de pesos moleculares.

RESULTADOS

Fraccionamiento subcelular

Por el método de fraccionamiento subcelular se recuperaron las siguientes fracciones: fracción nuclear (N); fracción mitocondrial (M); fracción lisosomal (L); pellet (P) y fracción soluble (S).

Al homogeneizado y a las fracciones obtenidas se les determinó proteínas, fosfatasa ácida como marcador lisosomal, octopina deshidrogenasa como marcador citosólico y actividad proteolítica a pH 3.5.

En la figura 1 se representa la distribución subcelular de estas actividades enzimáticas, observándose que la mayor cantidad específica relativa de fosfatasa ácida corresponde a la fracción lisosomal. Fig. 1A. En cambio, las actividades octopino deshidrogenasa y proteolítica de pH 3.5 se distribuyen en mayor cantidad en la fracción soluble. Fig. 1B y 1C.

Caracterización de la actividad proteolítica ácida

a) Efecto de pH

Se determinó el pH óptimo de la actividad proteolítica de la fracción soluble sobre la digestión de hemoglobina como sustrato en un rango entre 2.2 y 5.0. El pH óptimo está alrededor de 3.5. Fig. 2.

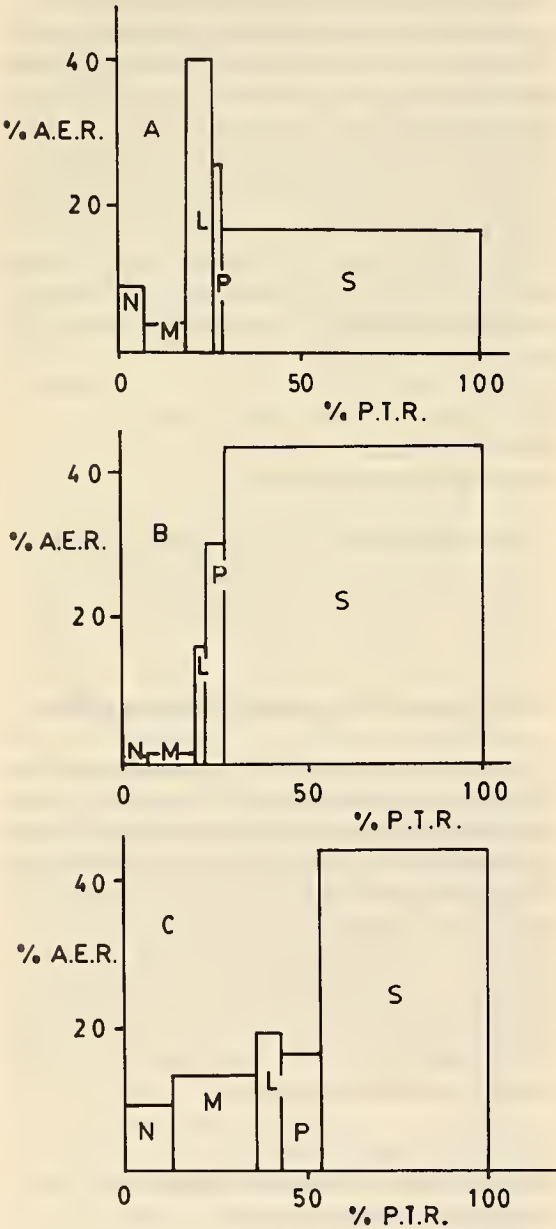


FIGURA 1: A los productos de un mismo fraccionamiento subcelular: núcleos, mitocondrias, lisosomas, pellet y fracción soluble, se les determinó fosfatasa ácida (A); octopina deshidrogenasa (B) y actividad proteolítica (C) en tejido glandular de Leiblein. Las actividades enzimáticas fueron medidas en núcleos (N), mitocondrias (M), lisosomas (L), pellet (P) y fracción soluble (S). La actividad expresada en % de actividad específica relativa (A.E.R.) se relaciona con el % de proteína total relativa (P.T.R.).

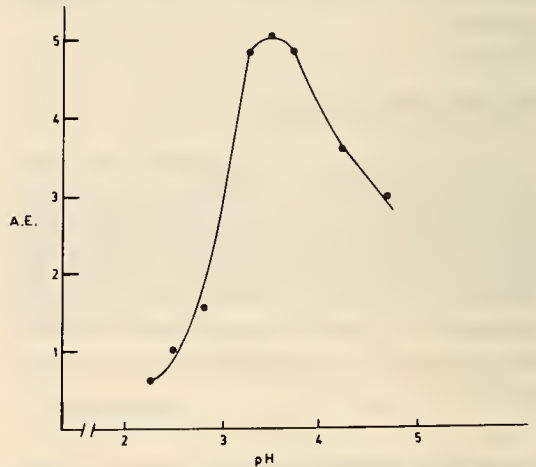


FIGURA 2: Efecto de pH en la actividad enzimática específica (AE) sobre digestión de hemoglobina. La preparación enzimática fue incubada por 30 min a 45°C en tampón citrato 0.25 M a pHs entre 2.2 y 5.0.

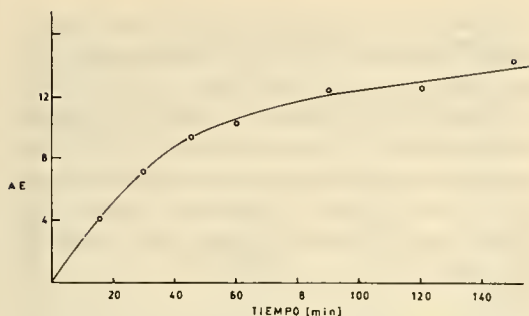


FIGURA 3: Curva de progreso de la actividad enzimática específica (AE) proteolítica. La fracción soluble fue incubada a 45°C en tampón citrato 0.25 M pH 3.5.

b) Curva de progreso

La curva de progreso de la preparación enzimática se muestra en la figura 3. Se observa que a

los 60 minutos se logra una actividad específica de 10,250.

c) Estabilidad de la preparación enzimática a diferentes temperaturas

Se investigó la estabilidad de la preparación enzimática a temperaturas de 4, 20, 37, 54 y 57°C determinándose la actividad remanente a los 60 y a los 100 min. Los resultados se muestran en la tabla I.

d) Actividad proteolítica frente a diferentes sustratos proteicos

En la tabla II se muestra la actividad proteolítica de la preparación enzimática sobre cuatro sustratos proteicos. El sustrato preferencial fue hemoglobina de bovino. También fueron degradadas caseína, albúmina de bovino y ovoalbúmina, aunque con mucho menor efectividad.

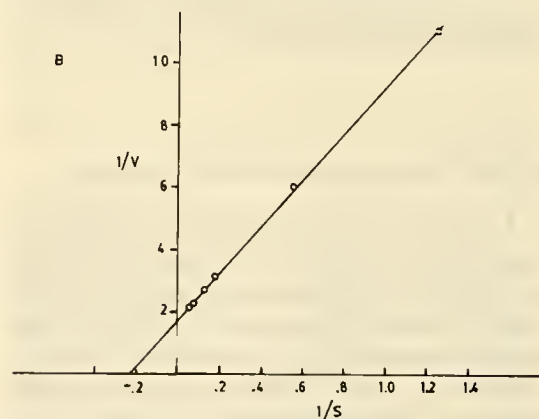
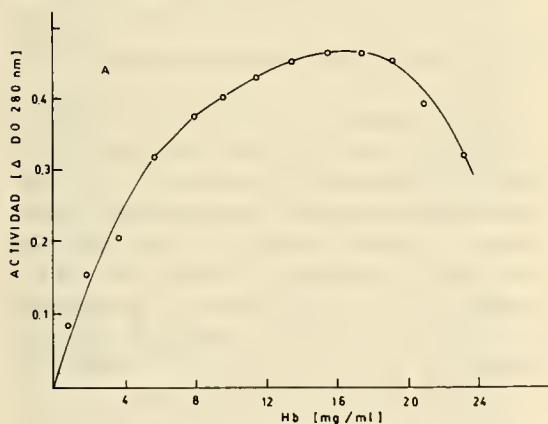


FIGURA 4: Efecto de la concentración de sustrato sobre la actividad enzimática. La actividad enzimática fue ensayada en tampón citrato 0.25 M pH 3.5 con concentraciones de sustrato entre 1 y 23 mg/ml. (A) Efecto de la concentración de hemoglobina sobre la actividad enzimática; (B) Representación Lineweaver-Burk de dobles recíprocos de la cinética enzimática.

e) Efecto de la concentración de sustrato

El efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción enzimática se muestra en la figura 4A. La velocidad fue esencialmente máxima a una concentración de sustrato de 16 mg/ml. Con un incremento de la concentración sobre este nivel se observa una inhibición de la actividad proteolítica. El valor de la

constante de Michaelis fue determinado hasta concentraciones de 16 mg/ml. El valor de esta constante determinado por Lineweaver-Burk fue de 4.35 mg/ml. Figura 4B.

f) Determinación de pesos moleculares

La estimación del peso molecular de la proteasa ácida fue medida en una columna calibrada

de Sephadex G-200. El volumen de elución de la actividad enzimática y los de las proteínas patrones de referencia graficados contra los logaritmos de sus pesos moleculares se muestran en la figura 5. El peso molecular de la proteasa ácida estimado por este método fue de 35.400.

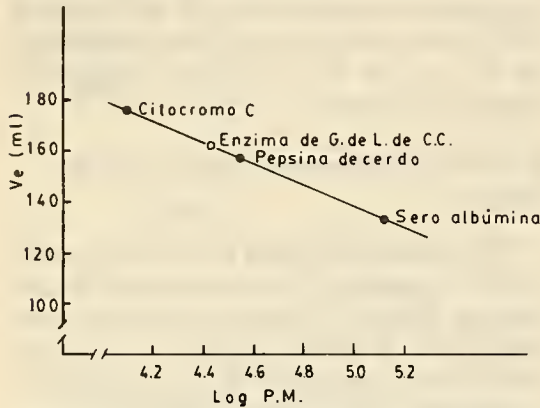


FIGURA 5: Estimación de peso molecular de la proteasa ácida. La solución de enzima fue aplicada a una columna de Sephadex G-200 de 50 x 2.2 cm.

g) Acción de efectores sobre la actividad preteolítica

La acción de numerosos activadores e inhibidores sobre la actividad enzimática se muestran en la tabla III. Dithiothreitol, glutatión y cisteína, protectores de grupos SH presentan una gran activación sobre la proteólisis. Pb^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} y Zn^{2+} tienen un discreto efecto inhibitorio sobre la actividad. El efecto de la preincubación con reactivos con afinidad por los grupos tioles fue también determinado. La inhibición con p-hidroximercuri-benzoato y monoyodo-acetato sugiere que la enzima es una tior-proteinasas. Urea y $HgCl_2$ presentan una fuerte inhibición sobre la proteólisis.

DISCUSION

El molusco marino *Concholepas concholepas* es un recurso natural importante, autóctono de la costa chilena y del sur del Perú y además el único de su especie que no se ha extinguido todavía.

Estudios de microscopía electrónica realizados por Ponce et al. (1988: 322) indican una similitud morfológica de la glándula de Leiblein con células secretoras de glándulas salivales y páncreas. Cate (1986: 376); Stryer (1988: 780). Por esta razón hemos investigado en este tejido la presencia de una actividad proteolítica ácida que tendría una función en la digestión proteica de esta especie descrita con hábitos alimentarios carnívoros.

Según los resultados del fraccionamiento subcelular, la actividad proteolítica ácida se ubica en la fracción soluble del tejido descartándose la posibilidad de una proteasa asociada a la fracción lisosomal. La posibilidad que durante el fraccionamiento subcelular se contamine la fracción soluble con proteasas ácidas lisosomales es evidente, pero considerando que el marcador enzimático de lisosomas se expresa mayoritariamente como actividad específica relativa justamente en esta fracción y la actividad proteolítica se expresa mayoritariamente en la fracción soluble, postulamos que esta enzima se encuentra en el citosol. Figura 1A y 1C.

El pH óptimo de esta actividad preteolítica utilizando hemoglobina como sustrato es 3.5. Figura 2. En este sentido es semejante al pH óptimo descrito para gastricsina gástrica de *Merluccius gayi*, Sánchez-Chiang et al. (1981: 251), pero diferente al de catepsina E de hígado de rata que es entre 3.0 y 3.2; al de catepsina E de hueso de conejo que es de 2.5 y al de pepsina de peces que es alrededor de 1.5. Yamamoto et al. (1978: 499); Sánchez-Chiang, L. et al. (1982: 129).

Con respecto a la estabilidad de la preparación enzimática a pH 7.0, la enzima es apreciablemente resistente entre 20 y 37°C; sin embargo, pierde drásticamente gran parte de su actividad a temperaturas de 57°C. La alta estabilidad de pH neutro y a temperatura de 4°C tiene importancia para el aislamiento y conservación de la preparación. Tabla I.

En relación a la especificidad de sustrato, tanto la caseína como la albúmina de bovino y especialmente la ovoalbúmina son pobremente hidrolizadas por la preparación enzimática en comparación con el sustrato hemoglobina de bovino, lo cual concuerda con una característica general de las proteasas ácidas digestivas y de catepsina D. Tabla II. Yamamoto et al. (1978: 499).

TABLA I: ESTABILIDAD DE FRACCIONES DE GLANDULA DE LEIBLEIN A DIFERENTES TEMPERATURAS EN FUNCION DEL TIEMPO.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)		
	0	60	100
4	100	100	100
20	100	95	92
37	100	88	78
45	100	62	60
57	100	27	26

La preparación enzimática se preincubó a temperaturas de 4, 20, 37, 45 y 57°C durante 60 min. Luego de este tiempo se procedió a determinar la actividad específica, comparando los valores encontrados con los de experimentos controles correspondientes a tiempo 0 de preincubación. Experimentos similares se realizaron de la misma manera, a las mismas temperaturas de preincubación, pero por espacio de 100 min. Los valores están expresados en % de actividad enzimática remanente.

TABLA II: ACTIVIDAD ENZIMATICA DE FRACCIONES DE GLANDULA DE LEIBLEIN FRENTE A SUSTRATOS PROTEICOS

Sustrato	Concentración	Actividad Enzimática
	%	%
1 Hemoglobina de bovino	1.25	100
2 Caseína	1.25	31.0
Caseína	2.50	55.30
3 Albúmina de bovino	1.25	55.60
Albúmina de bovino	2.50	18.30
Albúmina de bovino	5.00	8.90
4 Ovoalbúmina	1.25	5.70

En relación al efecto de la concentración de sustrato sobre la preparación enzimática, la enzima es inhibida por altas concentraciones de hemoglobina de bovino, como se muestra en la figura 4A. Este tipo de inhibición por sustrato ha sido también reportado para otras proteasas ácidas como catepsinas D y E y actualmente no existe una razón que la pueda explicar. Yamamoto et al (1978: 499). El valor de Km determinado con

concentraciones de sustrato hemoglobina hasta 16 mg/ml de 4.35 mg/ml es significativamente mayor que valores determinados para catepsinas, lo que estaría de acuerdo con su calidad de proteasa digestiva extracelular.

La estimación de peso molecular fue de 35.400. Figura 5. Es semejante al peso molecular de pepsina de especies superiores cuyo valor varía entre 32.700 y 35.500. Como la determinación del peso molecular se hizo a pH 5.6, cabría discutir la posibilidad de que lo que se determinó sería el peso molecular del zimógeno de la enzima, dado que generalmente estas enzimas proteolíticas digestivas se secretan a la forma de precursores que se activan en ambiente ácido. Bohak (1969: 4638).

TABLA III: ACCION DE EFECTORES SOBRE LA ACTIVIDAD PROTEOLITICA DE LA GLANDULA DE LEIBLEIN

La preparación enzimática fue preincubada con cada uno de los efectores a las concentraciones indicadas por 10 minutos a 45°C.

Efeotor	Concentración	Actividad enzimática
Control	—	100
dithiothreitol	4 mM	215.0
glutation	8 mM	200.0
cisteína	6 mM	125.0
2-mercaptoetanol	10 mM	119.60
KCN	10 mM	104.70
Pb (NO ₃) ₂	10 mM	97.90
CaCl ₂	10 mM	92.50
EDTA	10 mM	91.90
MgCl ₂	10 mM	90.30
NaCl	10 mM	89.20
ZnCl ₂	10 mM	86.50
p-hidroximercuri-benzoato	1 mM	68.34
monoyodo acetato	10 mM	61.60
urea	6 mM	24.40
MgCl ₂	10 mM	24.0

En relación a la acción de efectores: el Zn⁺² inhibe ligeramente la actividad enzimática a concentración 10 mM, tal como ocurre con las catepsinas D, presentándose un efecto inhibitorio. El efecto de cianuro 10 mM no se manifiesta

sobre esta actividad enzimática, tal como ocurre con catepsinas D, y a diferencia de catepsinas E donde se inhibe el 100% de la actividad. Sin embargo, una apreciable inhibición fue observada con los reactivos p-hidroximercuribenzoato y monoyodo acetato. Esto nos estaría indicando que estamos en presencia de una tiolproteinasa, lo que se corrobora por el efecto estimulador de cisteína, glutatión y dithiothreitol.

Al preincubar la preparación enzimática con urea 6 M se presenta una drástica inhibición enzimática tal como ocurre con catepsinas D, donde la inhibición es completa. Sin embargo, este efecto es diferente al que ocurre con catepsinas E, donde bajo las mismas condiciones se conserva el

72% de la actividad. Yamamoto. (1978: 499).

En conclusión, la glándula de Leiblein en esta especie de moluscos carnívoros jugaría un rol en la digestión proteolítica de la dieta mediante la secreción de una actividad proteásica ácida. Esta enzima ejecutaría su función en el largo trayecto del esófago posterior del *Concholepas concholepas* antes de llegar al estómago. (Datos confirmados, no presentados en esta publicación, indican la presencia de esta enzima en el esófago). Dado el volumen de la glándula y la gran cantidad de secreción enzimática que presenta, su función digestiva sería la más importante y se completaría con la actividad proteolítica aportada por la glándula digestiva.

BIBLIOGRAFIA

- Alveal, K. 1986. Una proposición para la administración del recurso alga en Chile. II Congreso de Algas Marinas Chilenas, Valdivia: 1-11.
- Andrews, P. 1964. Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.* 91: 223-233.
- Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Gen. Physiol.* 22: 79-89.
- Appelmans, F., Wattiaux, R., De Duve, C. 1955. Tissue fractionation studies. *Biochem. J.* 59: 438-445.
- Bohak, Z. 1969. Purification and characterization of chicken pepsinogen and chicken pepsin. *J. Biol. Chem.* 244: 4638-4648.
- Carvajal, N., Kessi, E. 1987. Kinetic mechanism of octopin dehydrogenase from the muscle of the sea mollusc *Concholepas concholepas*. *Biochimica et Biophysica Acta.* 953: 14-19.
- Castilla, J.C., Guisado, C.H. y Cancino, J. 1979. Aspectos ecológicos y conductuales relacionados con la alimentación de *Concholepas concholepas*. *Biología Pesquera de Chile.* 12: 99-114.
- Cate, T. 1986. Histología oral. Editorial Médica Panamericana: 376.
- Franc, A. 1968. Sous-classe des Prosobranches. In: P.P. Grassé (Ed.) *Traité de Zoologie*, 5(3):40-324.
- Huaquín, L. 1966. Anatomía de *Concholepas concholepas* (Bruguere) 1789. Memoria para optar al título de Profesor en Ciencias Naturales con Mención en Biología. Universidad Católica de Chile: 53 págs.
- León, O., Morán, A., González, R. 1982. Purification and characterization of pyruvate kinase from muscle of the sea mollusk *Concholepas concholepas*. *Com. Biochem Physiol.* 72B: 65-69.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Landall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Maldonado, R. y Karlsruher, H. 1965. Estudio microscópico e histoquímico de *Concholepas concholepas*. *Revista de Biología Marina. Departamento de Oceanología de la Universidad de Chile, Viña del Mar.* 12 (1-3): 121-127.
- Ponce, O., Magaña, A., Goset, C. 1988. Estudio funcional y morfológico de la glándula de Leiblein de *Concholepas concholepas*. *Archivos de Biología y Medicina Experimentales.* Vol. 21, N° 2, R-322.
- Sánchez-Chiang, L., Ponce, O. 1981. Gastricins and gastricins from *Merluccius gayi*. Purification and properties. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol. 68B: 251-257.
- Sánchez-Chiang, L., Ponce, O. 1982. Purificación y propiedades de pepsinógeno y pepsina de *Merluccius gayi*. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción.* LIII: 129-143.
- Seed, R. 1983. Structural organization adaptative radiation and classification of mollusc: 1-54, in the *Mollusca*, Vol. 1, *Metabolic Biochemistry and Molecular Biomechanics.* Academic Press Inc. ISBN D-12-751401-5.
- Stryer, L. 1988. *Biochemistry* (III edition). W.H. Freeman and Company, New York: 780.
- Stuardo, J. 1979. Sobre la clasificación, distribución y variación de *Concholepas concholepas* (Bruguere, 1789): un estudio de taxonomía beta. *Biología Pesquera, Chile.* 12:5-38.
- Walter, K., Schütt, Ch. 1974. *Methods of enzymatic analysis.* Bergmeyer, H.V. 856-857.
- Ward, J. 1965. The digestive tract and its relation to feeding habits in the Stenoglossan Prosobranch *Coralliophila abbreviata*. *Canad. J. Zool.* 43, 3:447-464.
- Yamamoto, K., Katsuda, N., Kato, K. 1978. Affinity purification and properties of cathepsin E like acid proteinase from rat spleen. *Eur J. Biochem.* 92: 499-508.