

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO

Informe Científico¹

PERIODO ²: 2016-2017

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: DREON

NOMBRES: MAARCOS SEBASTIAN

Dirección Particular: Calle:

Localidad: La Plata CP: 1900

Dirección electrónica (donde desea recibir información, que no sea "Hotmail"):

2. TEMA DE INVESTIGACION

ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE PERIVITELINAS DEL GENERO
POMACEA

PALABRAS CLAVE (HASTA 3) bioquímica biofísica invertebrados

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Inv. Asistente Fecha: 2006

ACTUAL: Categoría: Inv. Independiente desde fecha: 2015

4. INSTITUCION DONDE DESARROLLA LA TAREA

Universidad y/o Centro: INIBIOLP (UNLP-CONICET)

Facultad: Ciencias Médicas

Departamento:

Cátedra:

Otros:

Dirección: Calle: 60 y 120 N°: s/n

Localidad: La Plata CP: 1900 Tel: 221-4824894

Cargo que ocupa: Investigador

5. DIRECTOR DE TRABAJOS (En el caso que corresponda)

Apellido y Nombres:

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: CP: Tel:

Dirección electrónica:

¹ Art. 11; Inc. "e"; Ley 9688 (Carrera del Investigador Científico y Tecnológico).

² El informe deberá referenciar a años calendarios completos. Ej.: en el año 2017 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2015 al 31-12-2016, para las presentaciones bianuales. Para las presentaciones anuales será el año calendario anterior.

.....
Firma del Director (si corresponde)

.....
Firma del Investigador

6. RESUMEN DE LA LABOR QUE DESARROLLA

Descripción para el repositorio institucional. Máximo 150 palabras.

Estudios estructura-función de proteínas de huevo de molusco invasores, plagas y vectores de parásitos.

7. EXPOSICION SINTETICA DE LA LABOR DESARROLLADA EN EL PERIODO.

Debe exponerse, en no más de una página, la orientación impuesta a los trabajos, técnicas y métodos empleados, principales resultados obtenidos y dificultades encontradas en el plano científico y material. Si corresponde, explicita la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.

Durante el periodo informado se desarrolló el plan de trabajo propuesto "ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE PERIVITELINAS DEL GENERO POMACEA".

En particular las investigaciones estuvieron dirigidas a avanzar en el conocimiento respecto al rol que este tipo de proteínas desempeñan en la estrategia reproductiva de caracoles de agua dulce del género Pomacea, tomando como modelos de estudio a las especies *P. canaliculata*, *P. maculata*, *P. scalaris* y *P. diffusa*.

En este sentido, se culminaron los trabajos respecto a la caracterización estructural y funcional de PmPV1, la principal perivitelina de *Pomacea maculata* (Pasquevich et al., 2017). Además, se culminaron y enviaron para su consideración para publicación (Ituarte et al., PLOS ONE) los resultados respecto a la actividad lectina de PsSC, principal perivitelina de *P. scalaris*.

Por otro lado también se completaron los estudios respecto a la caracterización bioquímica de la glándula del albumen de hembras de *P. canaliculata* y su toxicidad sobre potenciales depredadores así como la caracterización estructural y funcional de los precursores de PcOvo y PcPV2 sintetizadas en este órgano (Cadierno et al., 2017a; 2017b). También se completó el estudio referido a la identificación, en la glándula del albumen de *P. canaliculata*, de genes de referencia para ser usados en estudios reproductivos de la especie, el cual fue aceptado para su publicación (Cadierno et al., MALACOLOGIA). Estos estudios corresponden al plan de tesis doctoral de la Lic. María Pilar Cadierno, la cual fue presentada en el año 2017 (Ver CV Dreon).

Finalmente, durante el periodo informado también se iniciaron estudios estructurales y funcionales de la principal perivitelina de *P. diffusa* (PdPV1), la cual es, al igual que en las otras especies previamente estudiadas, una caroteno-proteína altamente estable frente a la temperatura y cambios de pH, además de resistir proteasas gastrointestinales. Al igual que su ortólogo PsSC, mostró actividad lectina, la cual hemos comenzado a caracterizar mediante ensayos de hemaglutinación. Estos estudios corresponden al plan de tesis doctoral de la Lic. Tabata Romina Brola (Ver CV Dreon).

8. TRABAJOS DE INVESTIGACION REALIZADOS O PUBLICADOS EN ESTE PERIODO.

8.1 PUBLICACIONES. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellas publicaciones en las que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Toda publicación donde no figure dicha mención no debe ser adjuntada porque no será tomada en consideración. A cada publicación, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden que figuran en ella, lugar donde fue publicada, volumen, página y año. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparece en la publicación. La copia en papel de cada publicación se presentará por separado. Para cada publicación, el investigador deberá, además, aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del trabajo y, para aquellas en las que considere que ha hecho una contribución de importancia,*

deberá escribir una breve justificación. Asimismo, para cada publicación deberá indicar si se encuentra depositada en el repositorio institucional CIC-Digital.

1. APPLE SNAIL PERIVITELLIN PRECURSOR PROPERTIES HELP EXPLAIN PREDATORS FEEDING BEHAVIOR. María Pilar Cadierno, Marcos Sebastián Dreon, Horacio Heras. *Physiological and Biochemical Zoology* 90(4) 2017a, pp 461–470.

2. THE INFLUENCE OF ENERGY, NUTRITIONAL VALUE AND NOXIOUSNESS OF PREY IN SEX- AND SIZE-BIASED PREDATION BY SNAIL KITES IN SOUTHERN SOUTH AMERICA. M. Pilar Cadierno, Silvana Burela, Marcos S. Dreon, Pablo R. Martín, Horacio Heras. *Emu-Austral Ornithology* 2017b. <http://dx.doi.org/10.1080/01584197.2017.1338113>.

3. CONVERGENT EVOLUTION OF PLANT AND ANIMAL EMBRYO DEFENCES BY HYPERSTABLE NON-DIGESTIBLE STORAGE PROTEINS. María Y. Pasquevich, Marcos S. Dreon, Jian-Wen Qiu, Huawei Mu and Horacio Heras. *Scientific Reports* 2017. DOI:10.1038/s41598-017-16185-9

8.2 TRABAJOS EN PRENSA Y/O ACEPTADOS PARA SU PUBLICACIÓN. *Debe hacer referencia exclusivamente a aquellos trabajos en los que haya hecho explícita mención de su calidad de Investigador de la CIC (Ver instructivo para la publicación de trabajos, comunicaciones, tesis, etc.). Todo trabajo donde no figure dicha mención no debe ser adjuntado porque no será tomado en consideración. A cada trabajo, asignarle un número e indicar el nombre de los autores en el mismo orden en que figurarán en la publicación y el lugar donde será publicado. A continuación, transcribir el resumen (abstract) tal como aparecerá en la publicación. La versión completa de cada trabajo se presentará en papel, por separado, juntamente con la constancia de aceptación. En cada trabajo, el investigador deberá aclarar el tipo o grado de participación que le cupo en el desarrollo del mismo y, para aquellos en los que considere que ha hecho una contribución de importancia, deberá escribir una breve justificación.*

1. VALIDATION BY QPCR OF REFERENCE GENES FOR REPRODUCTIVE STUDIES IN THE INVASIVE APPLE SNAIL POMACEA CANALICULATA. María Pilar Cadierno, Marcos S. Dreon, Horacio Heras. *MALACOLOGIA*

8.3 TRABAJOS ENVIADOS Y AUN NO ACEPTADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo, indicando el lugar al que han sido enviados. Adjuntar copia de los manuscritos.*

1. EGG DEFENSES OF A NON-INVASIVE APPLE SNAIL BY A LECTIN ALTER GUT MORPHOPHYSIOLOGY. Santiago Ituarte, Tabata Romina Brola, Patricia Elena Fernández, Huawei Mu, Jian-Wen Qiu, Horacio Heras and Marcos Sebastián Dreon. *PLOS ONE*.

8.4 TRABAJOS TERMINADOS Y AUN NO ENVIADOS PARA SU PUBLICACION. *Incluir un resumen de no más de 200 palabras de cada trabajo.*

8.5 COMUNICACIONES. *Incluir únicamente un listado y acompañar copia en papel de cada una. (No consignar los trabajos anotados en los subtítulos anteriores).*

8.6 INFORMES Y MEMORIAS TECNICAS. *Incluir un listado y acompañar copia en papel de cada uno o referencia de la labor y del lugar de consulta cuando corresponda. Indicar en cada caso si se encuentra depositado en el repositorio institucional CIC-Digital.*

9. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

9.1 DESARROLLOS TECNOLÓGICOS. *Describir la naturaleza de la innovación o mejora alcanzada, si se trata de una innovación a nivel regional, nacional o internacional, con qué financiamiento se ha realizado, su utilización potencial o*

actual por parte de empresas u otras entidades, incidencia en el mercado y niveles de facturación del respectivo producto o servicio y toda otra información conducente a demostrar la relevancia de la tecnología desarrollada.

9.2 PATENTES O EQUIVALENTES Indicar los datos del registro, si han sido vendidos o licenciados los derechos y todo otro dato que permita evaluar su relevancia.

9.3 PROYECTOS POTENCIALMENTE TRANSFERIBLES, NO CONCLUIDOS Y QUE ESTAN EN DESARROLLO. Describir objetivos perseguidos, breve reseña de la labor realizada y grado de avance. Detallar instituciones, empresas y/o organismos solicitantes.

9.4 OTRAS ACTIVIDADES TECNOLÓGICAS CUYOS RESULTADOS NO SEAN PUBLICABLES (desarrollo de equipamientos, montajes de laboratorios, etc.).

9.5 Sugiera nombres (e informe las direcciones) de las personas de la actividad privada y/o pública que conocen su trabajo y que pueden opinar sobre la relevancia y el impacto económico y/o social de la/s tecnología/s desarrollada/s.

10. SERVICIOS TECNOLÓGICOS. Indicar qué tipo de servicios ha realizado, el grado de complejidad de los mismos, qué porcentaje aproximado de su tiempo le demandan y los montos de facturación.

11. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

11.1 DOCENCIA

11.2 DIVULGACIÓN

En cada caso indicar si se encuentran depositados en el repositorio institucional CIC-Digital.

12. DIRECCION DE BECARIOS Y/O INVESTIGADORES. Indicar nombres de los dirigidos, Instituciones de dependencia, temas de investigación y períodos.

1. Codirección de la estudiante de doctorado Cadierno, María Pilar. Beca interna de postgrado tipo I. CONICET. Res. Núm. 4362 de fecha 07/12/2012. Inicio Abril de 2013.

2. Codirección de la estudiante de doctorado Brola, Tabata Romina. "Estrategias reproductivas de moluscos gasterópodos. Caracterización de la lectina PsSC de Pomacea scalaris (Caenogastropoda: Ampullariidae) y su rol en la defensa contra depredadores de huevos". Beca interna doctoral. CONICET. Res. Núm. 3902 de fecha 25/11/2015. Inicio Abril de 2016.

3. Codirección del Dr. Santiago Ituarte. Investigador Asistente CONICET. Resolución No. 1305/12

4. Codirección de I Dra. María Yanina Pasquevich. Investigador Asistente CONICET. Estudio estructural y funcional comparado de las carotenoproteínas de huevos de Pomacea (Mollusca: Gastropoda). Resolución No. 2002 del 29/05/2015.

13. DIRECCION DE TESIS. Indicar nombres de los dirigidos y temas desarrollados y aclarar si las tesis son de maestría o de doctorado y si están en ejecución o han sido defendidas; en este último caso citar fecha.

1. Codirección del estudiante de doctorado Cadierno, María Pilar. Tema: “Estrategias reproductivas de moluscos gasterópodos. Estudio de la glándula del albumen de hembras de *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae)”. Plan de Tesis aprobado en 12-2012 en la F. Cs. Naturales y Museo de la UNLP.
2. Dirección de la estudiante de doctorado Brola, Tabata Romina. Tema: “Estrategias reproductivas de moluscos gasterópodos. Caracterización de las defensas de los huevos de *Pomacea scalaris* y *Pomacea diffusa* (Caenogasteropoda: Ampullariidae)”. Plan de Tesis aprobado en 12-2016 en la F. Cs. Naturales y Museo de la UNLP.

14. PARTICIPACION EN REUNIONES CIENTIFICAS. *Indicar la denominación, lugar y fecha de realización, tipo de participación que le cupo, títulos de los trabajos o comunicaciones presentadas y autores de los mismos.*

1. Respuestas bioquímicas al curioso comportamiento de los depredadores de *Pomacea*. Cadierno, María Pilar; Burela, Silvana; Dreon, Marcos S.; Martín, Pablo R. y Heras, Horacio. II Congreso Argentino de Malacología. Agosto de 2016, Mendoza, Argentina.
2. Biochemical defenses of apple snails eggs. Understanding the success of an unusual reproductive strategy. Pasquevich. MY, Dreon MS, Mu H, Qiu JW, Heras H. 30th ESCPB Congress. Septiembre de 2016, Barcelona, España.
3. PERIVITELLIN SYNTHESIS ADAPTS TO REPRODUCTIVE ACTIVITY IN THE SNAIL *POMACEA CANALICULATA*. Cadierno MP, Saveanu L, Dreon MS, Martín PR, Heras H. LII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular. Noviembre de 2016, Córdoba, Argentina.
4. LECTINS AS DEFENSES. CHARACTERIZATION OF THE MAJOR EGG PROTEIN OF THE SNAIL *POMACEA DIFFUSA*. Brola T, Dreon MS, Heras H. LII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica y Biología Molecular. Noviembre de 2016, Córdoba, Argentina.
5. Estudio de los efectos del cadmio en la biología reproductiva de *Pomacea canaliculata*. Campoy Díaz, AD, Dreon, MS, Vega, IA. VI Congreso Argentino de la Sociedad de Toxicología y Química Ambiental de Argentina. Octubre de 2016, Córdoba, Argentina.
6. Lectins as egg defensive proteins of the genus *Pomacea* (Caenogastropoda, Ampullariidae). Structural and functional features related to aerial oviposition. Brola T, Ituarte S, Heras H and Dreon MS. Physiomar17, Septiembre 2017, Cambridge, Reino Unido.
7. Defensas bioquímicas contra patógenos y depredadores de los huevos de Ampullariidae. Ituarte, S., M.L. Giglio, T.R. Brola, M.P. Cadierno, M.Y. Pasquevich, M.S. Dreon & H. Heras. X Congreso Latinoamericano de Malacología. Octubre 2017, Piriápolis, Maldonado, Uruguay.
8. BIOSYNTHESIS IN THE ALBUMEN GLAND AS A LIMITING FACTOR FOR REPRODUCTIVE OUTPUT IN THE INVASIVE APPLE SNAIL *POMACEA CANALICULATA*. MP Cadierno, L Saveanu, MS Dreon, PR Martin and H Heras. Fourteenth International Congress on Invertebrate Reproduction and Development, Agosto 2017, Napoli-Firenze, Italia.
9. STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIP OF A NOVEL LECTIN FROM *Pomacea diffusa* SNAIL EGGS. Brola TR, Dreon MS and Heras H. Reunión Conjunta de las Sociedades de Biociencias, Noviembre 2017, Buenos Aires, Argentina.
10. EVOLUTIONARY TRENDS IN *Pomacea* EGG CAROTENOPROTEINS INVOLVED IN A BIOCHEMICAL DEFENSE SYSTEM. Pasquevich MY, Dreon MS and Heras H. Reunión Conjunta de las Sociedades de Biociencias, Noviembre 2017, Buenos Aires, Argentina.
11. DINÁMICA DE LOS PRINCIPALES COMPONENTES DE SECRECIÓN DEL COMPLEJO GLÁNDULA DEL ALBUMEN–GLÁNDULA DE LA CÁPSULA DE *Pomacea canaliculata* A LO LARGO DE SU CICLO REPRODUCTIVO. Cadierno MP, Saveanu L, Dreon MS, Martín PR y Heras H. Sexto Taller Biología de Ampullariidae. Diciembre 2017, Los Molles, Malague, Mendoza, Argentina.

12. LECTINAS COMO PROTEÍNAS DEFENSIVAS DEL GÉNERO *Pomacea* (CAENOCASTROPODA, AMPULLARIIDAE). CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES RELACIONADAS CON LA ESTRATEGIA DE OVIPOSICIÓN AÉREA. Brola T, Ituarte S, Heras H & Dreon MS. Sexto Taller Biología de Ampullariidae. Diciembre 2017, Los Molles, Malargue, Mendoza, Argentina.
13. ¿UNA NEUROTOXINA CON ACTIVIDAD ENTEROTÓXICA EN EL CLADO "*Pomacea canaliculata*"? Giglio M, Garro C, Ituarte S, Dreon MS, Caviedes-Vidal E y Heras H. Sexto Taller Biología de Ampullariidae. Diciembre 2017, Los Molles, Malargue, Mendoza, Argentina.
14. PROTEOMAS DE HUEVOS DE AMPULÁRIDOS CON ESTRATEGIAS DE OVIPOSICIÓN AÉREA Y SUMERGIDA. Ituarte S, Dreon MS, Mu H, Ip JCH, Qiu JW, Heras H. Sexto Taller Biología de Ampullariidae. Diciembre 2017, Los Molles, Malargue, Mendoza, Argentina.
15. ESTUDIO INTEGRAL DE LOS EFECTOS DEL CADMIO EN LA BIOLOGÍA REPRODUCTIVA DEL BIOINDICADOR *Pomacea canaliculata*. Campoy Díaz D, Dreon MS, Cadierno MP, Vega IA. Sexto Taller Biología de Ampullariidae. Diciembre 2017, Los Molles, Malargue, Mendoza, Argentina.
- 15. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC.** *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*
- 16. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO.** *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*
1. CIC. Investigador responsable. Subsidio Institucional. Resolución N° 48/16. Monto \$13.000.
 2. UNLP. Co-director del Proyecto. "Bioquímica comparada de las estrategias reproductivas de moluscos gasterópodos". Código 11/M197.
 3. CIC. Subsidio para Asistencia a Reuniones Científicas. Acta N° 1459/17. Monto \$25.000.
 4. CIC. Investigador responsable. Subsidio Institucional. Resolución N° 305/17. Monto \$16.000.
- 17. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO.** *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*
- 18. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.**
- 19. ACTUACION EN ORGANISMOS DE PLANEAMIENTO, PROMOCION O EJECUCION CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA.** *Indicar las principales gestiones realizadas durante el período y porcentaje aproximado de su tiempo que ha utilizado.*
- 20. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO.** *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*
1. Jefe de Trabajos Prácticos dedicación exclusiva, suplente. Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. Expediente No. 800-18.784/13, resolución No. 100. Desde el 1 de abril de 2014 a la fecha.
- 21. OTROS ELEMENTOS DE JUICIO NO CONTEMPLADOS EN LOS TITULOS ANTERIORES.** *Bajo este punto se indicará todo lo que se considere de interés para la evaluación de la tarea cumplida en el período.*

22. TITULO, PLAN DE TRABAJO A REALIZAR EN EL PROXIMO PERIODO. *Desarrollar en no más de 3 páginas. Si corresponde, explicité la importancia de sus trabajos con relación a los intereses de la Provincia.*

PROYECTO 1.

Proteínas defensivas en huevos del género Pomacea (Caenogastropoda, Ampullariidae). Rasgos estructurales y funcionales asociados a la estrategia de oviposición aérea.

Dado su alto valor nutritivo, los huevos de la mayoría de los animales están sometidos a intensa depredación. Una excepción en este sentido son los caracoles dulceacuícolas sudamericanos del género Pomacea que no registran depredadores en su ambiente natural. A diferencia de otros ampuláridos, estos caracoles presentan una estrategia reproductiva única en gasterópodos acuáticos: la oviposición aérea de puestas llamativamente coloreadas expuestas a altas temperaturas, radiación solar directa y depredadores [1,2]. En sus huevos encontramos un fluido perivitelino (FPV) que rodea al oocito, cuyas proteínas llamadas perivitelininas, además de nutrir al embrión, cumplen otras novedosas funciones que resultan una adaptación determinante a la hora de sortear las adversas condiciones en las que se desarrollan. La perivitelinina mayoritaria de Pomacea canaliculata, PcOvo, es una carotenoproteína que, además de conferirle la mencionada coloración a los huevos, actúa en la fotoprotección y defensa antioxidante del embrión durante su desarrollo [3], lo cual pareciera ser una característica de los gasterópodos de oviposición aérea [3–5]. Esta coloración actuaría también como una señal de alarma o aposemática para potenciales depredadores de huevos, advirtiendo de la presencia de una perivitelinina neurotóxica, PcPV2, con efecto letal en murinos [6,7] así como de la propia PcOvo, que es una proteína antinutritiva [8]. Un sistema similar, conformado por perivitelininas de similares características estructurales y funcionales, ha sido descrito en P. maculata [4]; una especie que se encuentra en el mismo clado que P. canaliculata. Contrasta con este sistema defensivo el caso de P. scalaris, especie perteneciente a otro clado, si bien su perivitelinina mayoritaria, PsSC, es también una carotenoproteína con funciones de fotoprotección y defensa antioxidante del embrión, resulta muy llamativa la ausencia de una neurotoxina en su FPV (no publicado) y que la propia PsSC presente una potente actividad lectina [9]. Resultados de una investigación en curso sugieren que esta actividad de PsSC no estaría involucrada en la defensa contra invasiones microbianas, sino en un sistema de defensa contra la depredación similar al descrito en plantas [10]. Este sistema alternativo sería compartido con P. diffusa donde resultados preliminares muestran actividad hemaglutinante en el FPV. Esta especie pertenece al mismo clado que P. scalaris, sugiriendo la existencia de diferentes sistemas de defensa contra depredadores dentro del género Pomacea, algunos con lectinas y otros con neurotoxinas como principales moléculas efectoras.

El objetivo general de este proyecto es profundizar el conocimiento acerca de la fisiología reproductiva de moluscos gasterópodos, estudiando de manera comparada las funciones que cumplen las perivitelininas de Pomacea tomando como modelo de estudio a la especie P. diffusa. Se espera así poder realizar generalizaciones acerca del papel que desempeñan las perivitelininas en la estrategia reproductiva del género y ayudar a interpretar la notable capacidad de adaptación a diferentes ambientes que presentan varias de sus especies. Asimismo el estudio de lectinas aún desconocidas podría representar un valioso acervo de biomoléculas pasibles de transferir al sector biotecnológico.

En particular se propone:

a. Caracterizar funcionalmente el FPV de P. diffusa, evaluando la presencia de neurotoxinas y su actividad hemaglutinante.

b. Aislar y caracterizar estructuralmente la principal perivitelinina de P. diffusa (a la que denominaremos PdPV1). Determinando la secuencia aminoacídica de sus subunidades, su organización estructural, su estabilidad frente a altas temperaturas y variaciones de pH y su resistencia a proteasas digestivas

c. Caracterizar la actividad hemaglutinante en el FPV identificando y aislando la molécula responsable, determinando su espectro de afinidades por diferentes carbohidratos y evaluando su efecto sobre el epitelio digestivo de un potencial depredador.

Con los resultados obtenidos se espera aportar conocimiento que ayude a interpretar la evolución de estas defensas bioquímicas de embriones, acercando respuestas respecto a la presencia de lectinas y/o ausencia de neurotoxinas en los 2 principales clados que agrupan a las especies de Pomacea [11]. Asimismo se espera poder correlacionar estas diferencias con la restringida distribución geográfica y la menor capacidad de invasión de *P. scalaris* y *P. diffusa* (clado *bridgesii*) respecto a *P. canaliculata* y *P. maculata* (clado *canaliculata*).

PROYECTO 2.

Caracterización estructural y funcional de la hemocianina de *Pomacea canaliculata*.

El caracol de agua dulce *P. canaliculata* (Lamarck, 1822) (Caenogastropoda, Ampullariidae), es una especie representativa de la malacofauna de nuestro país que ha adquirido gran notoriedad internacional por haber invadido importantes regiones de Asia y de la Polinesia donde se ha convertido en una plaga de los arrozales y de otros cultivos, habiendo sido incluida por la World Conservation Union entre las 100 peores especies invasoras [12]. Además, es capaz de actuar como hospedador intermediario del nematode *Angiodstrongylus cantonensis* causante de la meningoencefalitis eosinofílica humana [13]. Nuestro grupo de investigación tiene más de 20 años de experiencia en el estudio de diferentes aspectos de la bioquímica y fisiología de esta especie (ver CV director), siendo pionero en el estudio de sus lipoproteínas hemolinfáticas [14].

En la hemolinfa de estos moluscos, además de lipoproteínas, encontramos como proteína mayoritaria al pigmento respiratorio hemocianina (Hc), una proteína extracelular de gran tamaño presente en muchas especies de artrópodos y moluscos. Si bien su principal función es el transporte de oxígeno molecular, en las últimas décadas se ha acumulado evidencia respecto a que estas moléculas son proteínas multifuncionales asociadas al desarrollo, homeostasis, hemostasia y respuesta inmune de invertebrados [15]. Desde el punto de vista estructural, las Hc presentan varias características comunes como ser una estructura oligomérica de elevada estabilidad térmica (>90°C), altamente glicosilada y con un sitio activo, de unión a oxígeno molecular, compuesto por dos átomos de cobre (CuA y CuB) cada uno de ellos coordinados con 6 residuos de histidina altamente conservados. La presencia de este sitio activo ubica a este tipo de proteínas dentro de la amplia familia de proteínas de cobre tipo III. En moluscos, las Hc se encuentran organizadas en decámeros compuestos de subunidades de 350-450 Kda con estructura de cilindros huecos pudiendo asociarse en didecámeros o tridecámeros [16], generando colosales estructuras proteicas que pueden superar los 10 MDa.

Como fuera mencionado anteriormente, las Hc son proteínas multifuncionales que participan en la respuesta inmune innata de moluscos y artrópodos. En este sentido, si bien los invertebrados carecen de inmunidad adquirida, presentan un robusto sistema inmune innato con una importante complejidad [15]. Las Hc participarían en el sistema inmune de estos organismos a través de (1) el proceso de melanización, a través de la activación de la cascada Pro-fenoloxidasa y (2) la generación de péptidos antimicrobianos (AMP) [17].

Finalmente, un aspecto interesante de las Hc de moluscos es en el campo de la investigación médica, destacándose entre ellas la Hc de *Megathura crenulata* (KLH). Esta proteína es actualmente empleada como adyuvante en diferentes protocolos de inmunización e inclusive como inmunoestimulante en algunas terapias antitumorales [18], propiedades que derivan de su gran tamaño molecular y de los oligosacáridos en la periferia de su estructura [19,20]. Estas características representan una dificultad a la

hora de estudiar estructuralmente a las Hc de moluscos mediante técnicas como la difracción de rayos X o la resonancia magnética nuclear entre otras.

Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio confirman la elevada concentración de Hc en la hemolinfa de estos caracoles, lo que vuelve relativamente sencillo la obtención de grandes cantidades de proteína con alta pureza desde su fuente natural. Esto convierte a la Hc de *P. canaliculata* en un excelente modelo para el estudio de aspectos estructurales y funcionales de este tipo de proteínas.

El objetivo general de este plan de trabajo es profundizar el conocimiento estructural y funcional de este tipo de proteínas de manera de interpretar su participación en el sistema inmune innato de moluscos, tomando como modelo de estudio un molusco gasterópodo de interés económico-sanitario y representativo de nuestra región. Con esta información, se espera además una mejor evaluación de su potencial de aplicación biotecnológico/biomédico.

En particular se propone:

- a. Caracterizar estructuralmente la Hc determinando su peso molecular, composición apoproteica y la estructura primaria de su/s subunidad/es.
- b. Estudiar su estabilidad estructural frente a variaciones de pH y temperatura.
- c. Estudiar el rol de la Hc de *P. canaliculata* en la defensa contra invasiones microbianas, evaluando la presencia de actividad fenol-oxidasa intrínseca e inducible y su actividad hemaglutinante y antimicrobiana.
- d. En una etapa posterior de este proyecto, se espera abordar el estudio de la capacidad de la Hc de esos moluscos de generar AMPs.
- e. Evaluar su capacidad de estimular el sistema inmune de murinos.

Bibliografía

1. Martín, Pablo R. and Estebenet A. Interpopulation variation in life history of *Pomacea canaliculata* (gastropoda: Ampullariidae) in southwestern Buenos Aires Province. Argentina. 2002;4: 153–163.
2. Albrecht EA, Carreño NB, Castro-Vazquez A. A quantitative study of copulation and spawning in the South American apple-snail, *Pomacea canaliculata* (Prosobranchia: Ampullariidae). *Veliger*. 1996;39: 142–147.
3. Dreon MS, Schinella G, Heras H, Pollero RJ. Antioxidant defense system in the apple snail eggs, the role of ovorubin. *Arch Biochem Biophys*. 2004;422. doi:10.1016/j.abb.2003.11.018
4. Pasquevich MY, Dreon MS, Heras H. The major egg reserve protein from the invasive apple snail *Pomacea maculata* is a complex carotenoprotein related to those of *Pomacea canaliculata* and *Pomacea scalaris*. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol*. 2014;169. doi:10.1016/j.cbpb.2013.11.008
5. Ituarte S, Dreon MS, Ceolín M, Heras H. Isolation and characterization of a novel perivitellin from the eggs of *Pomacea scalaris* (Mollusca, Ampullariidae). *Mol Reprod Dev*. 2008;75. doi:10.1002/mrd.20880
6. Dreon MS, Frassa MV, Ceolín M, Ituarte S, Qiu J-W, Sun J, et al. Novel Animal Defenses against Predation: A Snail Egg Neurotoxin Combining Lectin and Pore-Forming Chains That Resembles Plant Defense and Bacteria Attack Toxins. *PLoS One*. 2013;8. doi:10.1371/journal.pone.0063782
7. Heras H, Frassa MV, Fernández PE, Galosi CM, Gimeno EJ, Dreon MS. First egg protein with a neurotoxic effect on mice. *Toxicon*. 2008;52. doi:10.1016/j.toxicon.2008.06.022
8. Dreon MS, Ituarte S, Heras H. The role of the proteinase inhibitor ovorubin in apple snail eggs resembles plant embryo defense against predation. *PLoS One*. 2010;5. doi:10.1371/journal.pone.0015059
9. Ituarte S, Dreon MS, Ceolín M, Heras H. Agglutinating Activity and Structural Characterization of Scalarin, the Major Egg Protein of the Snail *Pomacea scalaris* (d'Orbigny, 1832). *PLoS One*. 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0050115

10. Peumans WJ, Van Damme EJ. Lectins as plant defense proteins. *Plant Physiol.* 1995;109: 347–352. doi:10.1104/pp.109.2.347
11. Hayes KA, Burks RL, Castro-Vazquez A, Darby PC, Heras H, Martín PR, et al. Insights from an integrated view of the biology of apple snails (caenogastropoda: Ampullariidae). *Malacologia.* 2015. doi:10.4002/040.058.0209
12. Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M. 100 of the World's Worst Invasive Alien Species A selection from the Global Invasive Species Database. Auckland, New Zealand: World Conservation Union (IUCN); 2000.
13. Lv S, Zhang Y, Chen SR, Wang LB, Fang W, Chen F, et al. Human angiostrongyliasis outbreak in dali, china. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009;3: e520. doi:10.1371/journal.pntd.0000520 [doi]
14. Garín CF, Pollero RJ. Isolation and characterization of a low density lipoprotein fraction from plasma of the aquatic snail *Ampullaria canaliculata*. *Comp Biochem Physiol.* 1995;B 111: 147–150.
15. Coates CJ, Nairn J. Diverse immune functions of hemocyanins. *Dev Comp Immunol.* 2014;45: 43–55. doi:10.1016/j.dci.2014.01.021
16. Lieb B, Gebauer W, Gatsogiannis C, Depoix F, Hellmann N, Harasewych MG, et al. Molluscan mega-hemocyanin: an ancient oxygen carrier tuned by a ~550 kDa polypeptide. *Front Zool.* 2010;7: 14. doi:10.1186/1742-9994-7-14
17. Zhuang J, Coates CJ, Zhu H, Zhu P, Wu Z, Xie L. Identification of candidate antimicrobial peptides derived from abalone hemocyanin. *Dev Comp Immunol.* Elsevier Ltd; 2015;49: 96–102. doi:10.1016/j.dci.2014.11.008
18. Palacios M, Tampe R, Del Campo M, Zhong TY, López MN, Salazar-Onfray F, et al. Antitumor activity and carrier properties of novel hemocyanins coupled to a mimotope of GD2 ganglioside. *Eur J Med Chem.* Elsevier Masson SAS; 2018;150: 74–86. doi:10.1016/j.ejmech.2018.02.082
19. Siddiqui NI, Idakieva K, Demarsin B, Doumanova L, Compernelle F, Gielens C. Involvement of glycan chains in the antigenicity of *Rapana thomasiana* hemocyanin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;361: 705–711. doi:10.1016/j.bbrc.2007.07.098
20. Arancibia S, Espinoza C, Salazar F, Del Campo M, Tampe R, Zhong TY, et al. A novel immunomodulatory hemocyanin from the limpet *Fissurella latimarginata* promotes potent anti-tumor activity in melanoma. *PLoS One.* 2014;9: e87240. doi:10.1371/journal.pone.0087240

Condiciones de la presentación:

- A. El Informe Científico deberá presentarse dentro de una carpeta, con la documentación abrochada y en cuyo rótulo figure el Apellido y Nombre del Investigador, la que deberá incluir:
 - a. Una copia en papel A-4 (puntos 1 al 22).
 - b. Las copias de publicaciones y toda otra documentación respaldatoria, en otra carpeta o caja, en cuyo rótulo se consignará el apellido y nombres del investigador y la leyenda "Informe Científico Período".
 - c. Informe del Director de tareas (en los casos que corresponda), en sobre cerrado.
- B. Envío por correo electrónico:
 - a. Se deberá remitir por correo electrónico a la siguiente dirección: infinvest@cic.gba.gob.ar (puntos 1 al 22), en formato .doc zipeado, configurado para papel A-4 y libre de virus.
 - b. En el mismo correo electrónico referido en el punto a), se deberá incluir como un segundo documento un currículum resumido (no más de dos páginas A4), consignando apellido y nombres, disciplina de investigación, trabajos publicados en el período informado (con las direcciones de Internet de las respectivas

revistas) y un resumen del proyecto de investigación en no más de 250 palabras, incluyendo palabras clave.

C. Sistema SIBIPA:

a. Se deberá petitionar el informe en la modalidad on line, desde el sitio web de la CIC, sistema SIBIPA (ver instructivo).

Nota: El Investigador que desee ser considerado a los fines de una promoción, deberá solicitarlo en el formulario correspondiente, en los períodos que se establezcan en los cronogramas anuales.