

CARRERA DEL INVESTIGADOR CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO Informe Científico¹

PERIODO ²: 2012-2013

Legajo N°:

1. DATOS PERSONALES

APELLIDO: DREON

NOMBRES: MARCOS SEBASTIAN

Dirección Particular: Calle: N°:

Localidad: CP: Tel:

Dirección electrónica (donde desea recibir información):

2. TEMA DE INVESTIGACION

ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE PERIVITELINAS DEL GENERO POMACEA

3. DATOS RELATIVOS A INGRESO Y PROMOCIONES EN LA CARRERA

INGRESO: Categoría: Inv. Asistente Fecha: 2006

ACTUAL: Categoría: Inv. Adjunto desde fecha: 2009

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: 0221 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 2008 deberá informar sobre la actividad del período 1°-01-2006 al 31-12-2007, para las presentaciones bianuales.

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

.....
Firma del Investigador

6. 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 determinar el papel que juegan las perivitelinas en la estrategia reproductiva de estos caracoles de agua dulce tomando como modelos de estudio a las especies Pomacea canaliculata y Pomacea scalaris.

Se lograron avances en diferentes aspectos del plan, por un lado se avanzó en la caracterización estructural y funcional de PsSC, la principal perivitelina de Pomacea scalaris. En este trabajo se describió a esta perivitelina como una lectina de alta estabilidad estructural (ver sección 7 - Ituarte et al., 2012). Por otro lado y como resultado de una exitosa colaboración iniciada en 2011 con el laboratorio del Dr. JW Qiu (Department of Biology, Baptist University, Hong Kong) se logró realizar un estudio proteómico del fluido perivitelino de huevos de P. canaliculata, siendo este el primero en un gasterópodo con una estrategia reproductiva de oviposición aérea. Aquí se logró identificar 59 perivitelinas y se determinó que la mayoría de ellas son sintetizadas en la glándula del albumen (ver sección 7 - Sun et al., 2012). Además, se realizó un estudio sobre la perivitelina-2 de P. canaliculata (PcPV2). En este sentido, estudios estructurales y funcionales de esta proteína la mostraron como una neurotoxina compuesta por una subunidad lectina y otra perforina, sugiriéndose la participación de esta molécula en un mecanismo de defensa de huevos contra depredadores (ver sección 7 - Dreon et al., 2013).

Finalmente, durante el periodo informado también se iniciaron los estudios sobre la caracterización bioquímica de la glándula del albumen de hembras de P. canaliculata y su toxicidad sobre potenciales depredadores de adultos. Estos estudios corresponden al plan de tesis doctoral de la Lic. María Pilar Cadierno (Ver CV Dreon).

Paralelamente, en este periodo se publicaron los resultados respecto al efecto del petróleo crudo liviano sobre la expresión diferencial de proteínas en el camarón de agua dulce Macrobrachium borellii y su empleo como biomarcador temprano de contaminación en el Río de la Plata (ver sección 7 - Pasquevich et al., 2013). Estos resultados corresponden a la Tesis Doctoral de la Dra. María Yanina Pasquevich, presentada en Marzo de 2012 (Ver CV Dreon).

Para los estudios estructurales de PsSC y PcPV2 fue necesario realizar ensayos de dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS) en el Laboratorio Nacional de Luz Sincrotron (LNLS), Campinas, Brasil. (Programa de ayuda financiera para investigadores de Instituciones Latinoamericanas y del Caribe). (ver CV-Dreon).

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

7.1 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.

1. FIRST PROTEOME OF THE EGG PERIVITELLINE FLUID OF A FRESHWATER GASTROPOD WITH AERIAL OVIPOSITION. Jin Sun, Huoming Zhang, Hao Wang, Horacio Heras, Marcos S. Dreon, Santiago Ituarte, Timothy Ravasi, Pei-Yuan Qian, and Jian-Wen Qiu. J. Proteome Res. 11 2012, pp 4240–4248.

Pomacea canaliculata is a freshwater snail that deposits eggs on solid substrates above the water surface. Previous studies have emphasized the nutritional and protective functions of the three most abundant perivitelline fluid (PVF) protein complexes (ovorubin, PV2, and PV3) during its embryonic development, but little is known about the structure and function of other less abundant proteins. Using 2-DE, SDS-PAGE, MALDI TOF/TOF, and LC-MS/MS, we identified 59 proteins from the PVF of *P. canaliculata*, among which 19 are novel. KEGG analysis showed that the functions of the majority of these proteins are “unknown” ($n = 34$), “environmental information processing” (10), 9 of which are related to innate immunity, and “metabolism” (7). Suppressive subtractive hybridization revealed 21 PVF genes to be specific to the albumen gland, indicating this organ is the origin of many of the PVF proteins. Further, the 3 ovarubin subunits were identified with 30.2–35.0% identity among them, indicating their common origin but ancient duplications. Characterization of the PVF proteome has opened the gate for further studies aiming to understand the evolution of the novel proteins and their contribution to the switch to aerial oviposition.

Participación personal: Diseño y desarrollo experimental, redacción del trabajo y discusión de los resultados.

2. AGGLUTINATING ACTIVITY AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF SCALARIN, THE MAJOR EGG PROTEIN OF THE SNAIL POMACEA SCALARIS (D,ORBIGNY, 1832). Santiago Ituarte, Marcos Sebastián Dreon, Marcelo Ceolín, Horacio Heras. PLoS ONE 7(11) 2012: e50115. doi:10.1371/journal.pone.0050115.<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0050115>

Apple snail perivitellins are emerging as ecologically important reproductive proteins. To elucidate if the protective functions of the egg proteins of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae), involved in embryo defenses, are present in other *Pomacea* species we studied scalarin (PsSC), the major perivitellin of *Pomacea scalaris*. Using small angle X-ray scattering, fluorescence and absorption spectroscopy and biochemical methods, we analyzed PsSC structural stability, agglutinating activity, sugar specificity and protease resistance. PsSC agglutinated rabbit, and, to a lesser extent, human B and A erythrocytes independently of divalent metals Ca^{2+} and Mg^{2+} were strongly inhibited by galactosamine and glucosamine. The protein was structurally stable between pH 2.0 to 10.0, though agglutination occurred only between pH 4.0 to 8.0 (maximum activity at pH 7.0). The agglutinating activity was conserved up to 60°C and completely lost above 80°C, in agreement with the structural thermal stability of the protein (up to 60°C). PsSC was able to withstand *in vitro* gastrointestinal digestion, and showed no trypsin inhibition activity. The presence of lectin activity has been reported in

eggs of other Pomacea snails, but here we link for the first time, this activity to an apple snail multifunctional perivitellin. This novel role for a snail egg storage protein is different from closely related *P.canaliculata* defensive proteins.

Participación personal: Diseño y desarrollo experimental, redacción del trabajo y discusión de los resultados.

3. NOVEL ANIMAL DEFENSES AGAINST PREDATION: A SNAIL EGG NEUROTOXIN COMBINING LECTIN AND PORE-FORMING CHAINS THAT RESEMBLES PLANT DEFENSE AND BACTERIA ATTACK TOXINS. Dreon MS, Frassa MV, Ceolín M, Ituarte S, Qiu J-W, Sun J, Fernandez PE, Heras H. PLoS ONE 8(5) 2013: e63782. doi:10.1371/journal.pone.0063782.

Although most eggs are intensely predated, the aerial egg clutches from the aquatic snail *Pomacea canaliculata* have only one reported predator due to unparalleled biochemical defenses. These include two storage-proteins: ovorubin that provides a conspicuous (presumably warning) coloration and has antinutritive and antigestive properties, and PcPV2 a neurotoxin with lethal effect on rodents. We sequenced PcPV2 and studied whether it was able to withstand the gastrointestinal environment and reach circulation of a potential predator. Capacity to resist digestion was assayed using small-angle X-ray scattering (SAXS), fluorescence spectroscopy and simulated gastrointestinal proteolysis. PcPV2 oligomer is antinutritive, withstanding proteinase digestion and displaying structural stability between pH 4.0–10.0. cDNA sequencing and protein domain search showed that its two subunits share homology with membrane attack complex/perforin (MACPF)-like toxins and tachylectin-like lectins, a previously unknown structure that resembles plant Type-2 ribosome-inactivating proteins and bacterial botulinum toxins. The protomer has therefore a novel AB toxin combination of a MACPF-like chain linked by disulfide bonds to a lectin-like chain, indicating a delivery system for the former. This was further supported by observing PcPV2 binding to glycocalyx of enterocytes *in vivo* and *in culture*, and by its hemagglutinating, but not hemolytic activity, which suggested an interaction with surface oligosaccharides. PcPV2 is able to get into predator's body as evidenced in rats and mice by the presence of circulating antibodies in response to sublethal oral doses. To our knowledge, a lectin-pore-forming toxin has not been reported before, providing the first evidence of a neurotoxic lectin in animals, and a novel function for ancient and widely distributed proteins. The acquisition of this unique neurotoxic/ antinutritive/storage protein may confer the eggs a survival advantage, opening new perspectives in the study of the evolution of animal defensive strategies.

Participación personal: Diseño y desarrollo experimental, redacción del trabajo y discusión de los resultados.

4. EFFECT OF CRUDE OIL PETROLEUM HYDROCARBONS ON PROTEIN EXPRESSION OF THE PRAWN *MACROBRACHIUM BORELLII*. M.Y. Pasquevich, M.S. Dreon, J.N. Gutierrez Rivera, C. Vázquez Boucard, H. Heras. Comparative Biochemistry and Physiology C 157 2013, pp 390-396. (ISSN: 0010-406X).

Hydrocarbon pollution is a major environmental threat to ecosystems in marine and freshwater environments, but its toxicological effect on aquatic organisms remains little studied. A proteomic approach was used to analyze the effect of a freshwater oil spill on the prawn *Macrobrachium borellii*. To this aim, proteins were extracted from midgut gland (hepatopancreas) of male and female prawns exposed 7 days to

a sublethal concentration (0.6 ppm) of water-soluble fraction of crude oil (WSF). Exposure to WSF induced responses at the protein expression level. Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) revealed 10 protein spots that were differentially expressed by WSF exposure. Seven proteins were identified using MS/MS and de novo sequencing. Nm23 oncoprotein, arginine methyltransferase, fatty aldehyde dehydrogenase and glutathione S-transferase were down-regulated, whereas two glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoforms and a lipocalin-like crustacyanin (CTC) were up-regulated after WSF exposure. CTC mRNA levels were further analyzed by quantitative real-time PCR showing an increased expression after WSF exposure. The proteins identified are involved in carbohydrate and amino acid metabolism, detoxification, transport of hydrophobic molecules and cellular homeostasis among others. These results provide evidence for better understanding the toxic mechanisms of hydrocarbons. Moreover, some of these differentially expressed proteins would be employed as potential novel biomarkers.

Participación personal: Diseño y desarrollo experimental, redacción del trabajo y discusión de los resultados.

7.2 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.*

7.3 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.*

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

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

7.6 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.*

8. TRABAJOS DE DESARROLLO DE TECNOLOGÍAS.

8.1 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.

8.2 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.*

8.3 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.*

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

8.5 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.

9. 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.*

10. PUBLICACIONES Y DESARROLLOS EN:

10.1 DOCENCIA

10.2 DIVULGACIÓN

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

2012-Codirección de la estudiante de grado Cadierno, María Pilar. Becas de estímulo a las vocaciones científicas 2011. "Estrategias reproductivas de moluscos gasterópodos. Estudio de la glándula del albumen de hembras de Pomacea canaliculata (Gastropoda: Ampullariidae)". Resolución P. N° 97/11. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP. Fecha de inicio 9/11, fecha de finalización 9/12

2013- Codirección de la estudiante de doctorado Cadierno, María Pilar. Beca de Investigación Científica y/o Tecnológica, nivel inicial. Financiada por el FONCyT. PICT 2011-1428 ANPCyT. Enero de 2013 a Marzo de 2013. No Expte 800-15343/13/.

2013- 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.

2013- Dirección de la estudiante de grado Brola, Tabata Romina. Becas de estímulo a las vocaciones científicas 2013. "Estrategias reproductivas de moluscos gasterópodos. Estudio estructural y funcional de la principal perivitelina de los huevos Pomacea scalaris (Gastropoda: Ampullariidae)". Resolución P. N° 230/13. Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP. Fecha de inicio 9/13, fecha de finalización 9/14.

2012- Codirección del Dr. Santiago Ituarte. Investigador Asistente CONICET. Resolución No. 1305/12

12. 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.*

2012-Codirección de la estudiante de doctorado Pasquevich, María Yanina. "Efecto de hidrocarburos hidrosolubles sobre el metabolismo y la expresión proteica del camarón *Macrobrachium borellii* (Crustacea Decapoda)". Facultad de Ciencias Naturales y Museo, UNLP. Resolución No. 176/2007. Tesis presentada en Marzo de 2012. Calificación: Sobresaliente. No. Acta 1181.

2013- 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.

13. 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. PCPV2 NEUROTOXIN FROM THE APPLE SNAIL POMACEA CANALICULATA EGGS: A PERIVITELLIN COMBINING PERFORIN AND LECTIN-LIKE CHAINS. Marcos S. Dreon, Santiago Ituarte, María Victoria Frassa, Patricia Fernandez and Horacio Heras. International meeting Physiomar 12. Septiembre 2012. Santiago de Compostela, España.

2. DEFENSIVE PROTEINS IN POMACEA: HEMAGGLUTINATING ACTIVITY OF PSSC, THE MAJOR EGG PERIVITELLIN OF *P. SCALARIS*. Santiago Ituarte, Marcos S. Dreon and Horacio Heras. International meeting Physiomar 12. Septiembre 2012. Santiago de Compostela, España.

3. FIRST INSIGHT INTO THE MAJOR EGG PROTEIN FROM THE APPLE SNAIL PERIVITELLIN FLUID POMACEA INSULARUM. Pasquevich MY, Dreon MS, Heras H. XLVIII Reunión anual de la Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular. Noviembre 2012. Mendoza, Argentina.

4. THE MAJOR EGG PROTEIN OF POMACEA SCALARIS IS A LIPO-GLYCO-CAROTENOPROTEIN WITH CITOTOXIC EFFECT ON CACO2 CELLS. Ituarte S, Brola T, Heras H and Dreon MS. 8th International Conference on Lipid Binding Proteins. November 2013. La Plata, Argentina.

5. THE PROMISE OF MANGANESE-DOPED ZINC OXIDE NANOPARTICLES AND PHOTODYNAMIC THERAPY FOR THE TREATMENT OF CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. Peña Luengas, Sandra; Marín, Gustavo; Rodríguez, Nieto; Dreon, Marcos; Roque, Gustavo; Nunez, Luis; Sanchez, Felipe; Tarditti, Adrian; Schinella, Guillermo; Pistaccio Luis, Goya Rodolfo, Rivera-Montalvo Luis, and Mansilla, Eduardo. ACS Senior Technical Meeting. November 2013. Aguadilla, Puerto Rico.

6. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN PARCIAL DE UN INHIBIDOR DE PROTEASAS DE LOS HUEVOS DE POMACEA CANALICULATA (GASTROPODA:

AMPULLARIIDAE) T. R. Brola, M. S. Dreon, y H. Heras. 1er. Congreso Argentino de Malacología. Septiembre 2013, La Plata, Argentina.

7. PRESENCIA DE UN ÓRGANO TÓXICO EN EL SISTEMA REPRODUCTOR FEMENINO DE POMACEA CANALICULATA (LAMARK, 1822) M. P. Cadierno; M. S. Dreon y H. Heras. 1er. Congreso Argentino de Malacología. Septiembre 2013, La Plata, Argentina.

8. MÉTODOS BIOQUÍMICOS PARA DIFERENCIAR LOS HUEVOS DE DOS ESPECIES SIMPÁTRICAS: POMACEA MACULATA Y POMACEA CANALICULATA (CAENOGASTROPODA: AMPULLARIIDAE) M. Y. Pasquevich, M. Dreon y H. Heras. 1er. Congreso Argentino de Malacología. Septiembre 2013, La Plata, Argentina.

9. ESTUDIO COMPARADO DE LA CAROTENOPROTEÍNA PmPV1 CON OTRAS CAROTENOPROTEÍNAS PRESENTES EN HUEVOS DE POMACEA (GASTROPODA: AMPULLARIIDAE) M. Y. Pasquevich, M. Dreon, S. Ituarte y H. Heras. 1er. Congreso Argentino de Malacología. Septiembre 2013, La Plata, Argentina.

10. MANGANESE-DOPED ZINC OXIDE NANOPARTICLES FOR THE TREATMENT OF B-CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA BY PHOTODYNAMIC THERAPY. Peña Luengas SL, Marín GH, Rodríguez Nieto F, Dreon MS, Roque G, Nunez L, Sanchez F, Tarditti A, Schinella G, Pistaccio LG, Goya R, Perales-Perez O, Rivera-Montalvo L, Mansilla E. XV International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. September 2013, Cologne, Germany.

14. CURSOS DE PERFECCIONAMIENTO, VIAJES DE ESTUDIO, ETC. *Señalar características del curso o motivo del viaje, período, instituciones visitadas, etc.*

15. SUBSIDIOS RECIBIDOS EN EL PERIODO. *Indicar institución otorgante, fines de los mismos y montos recibidos.*

2012-CIC. Investigador responsable. Subsidio Institucional. Resolución N° 2410/12. Monto \$5.600.

2012-2015. UNLP. Co-director del Proyecto. "Bioquímica comparada de las estrategias reproductivas de moluscos gasterópodos ". Código 11/N684. Monto \$8.102/año.

2012-CIC. Subsidio para Asistencia a Reuniones Científicas. Acta N 1369/12. Monto \$10.000.

2013-CIC. Investigador responsable. Subsidio Institucional. Resolución N° 243/13. Monto \$6.000.

16. OTRAS FUENTES DE FINANCIAMIENTO. *Describir la naturaleza de los contratos con empresas y/o organismos públicos.*

17. DISTINCIONES O PREMIOS OBTENIDOS EN EL PERIODO.

18. 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.*

19. TAREAS DOCENTES DESARROLLADAS EN EL PERIODO. *Indicar el porcentaje aproximado de su tiempo que le han demandado.*

Ayudante Diplomado rentado con funciones de Jefe de Trabajos Prácticos, dedicación exclusiva, suplente. Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP. Expediente No. 800-8592/11, resolución No. 428. Desde el 1 de junio de 2011 hasta el 31 de agosto de 2012.

Jefe de Trabajos Prácticos dedicación semi-exclusiva, suplente. Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Médicas, UNLP Expediente No. 800-13.693/12, resolución No. 713. Desde el 1 de septiembre de 2012 a la fecha.

20. 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.*

21. TITULO Y 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.*

ESTUDIOS ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES DE PERIVITELINAS DEL GENERO POMACEA

Los gasterópodos dulceacuícolas del género Pomacea (Ampullariidae) son nativos de América, y comprenden un grupo importante dentro de la malacofauna de nuestro país. Algunas de sus especies, como *P. bridgesi*, *P. canaliculata* y *P. scalaris*, fueron introducidas en el sudeste asiático, África, Estados Unidos y Hawaii donde se han convertido en plagas del agro alterando la dinámica de ciertos ecosistemas acuáticos (Carlsson, Nils O. L. et al. 2004; Cowie, R. H. 2002; Hayes, K. A. et al. 2008). Recientemente fue reportada la primera invasión de estos caracoles en Europa, en el delta del río Ebro, siendo la especie invasora identificada *P. insularum* (López, M. A. et al. 2010). Por otro lado, en el sudeste asiático estos caracoles son capaces de actuar como hospedadores intermediarios de *Angiostrongylus cantonensis*, aumentando el área de incidencia de la encefalitis eosinofílica humana causada por este nematode (Lv, S. et al. 2009b).

Nuestro laboratorio ha dedicado más de 15 años al estudio de la biología reproductiva de *P. canaliculata*, un modelo representativo de nuestra región que despierta especial interés por sus implicancias económico-sanitarias. A saber: (a) es un potencial agente de control biológico de gasterópodos transmisores de esquistosomiasis (Cazzaniga, N. J. 1990) evitando de esta manera el uso de compuestos químicos contaminantes del ambiente, (b) ha sido empleado con éxito en el control de malezas acuáticas en el sur de la Provincia de Buenos Aires (Estebenet, A. L. et al. 1990) y (c) como fue dicho antes, es vector de *Angiostrongylus cantonensis* causante de una meningoencefalitis humana (Lv, S. et al. 2009a) una parasitosis endémica de Asia, de la cual recientemente se han detectado focos de infección en Centroamérica (Slom, T. J. et al. 2002) y Brazil (Caldeira, R. L. et al. 2007).

- Las especies de Pomacea presentan la peculiar estrategia reproductiva de desovar fuera del agua, cementando sus puestas de colores intensos sobre distintos sustratos, quedando los huevos expuestos a insolación, desecación y depredación durante el desarrollo (Albrecht, E. A. et al. 1999; Estebenet, A. L. et al. 2002). A pesar de estas adversas condiciones los huevos completan su desarrollo llamando la atención la completa ausencia de depredadores a excepción de la hormiga de fuego (*Solenopsis geminata*, Arthropoda: Insecta) (Yusa, Y. 2001). Los huevos de *P. canaliculata* están provistos de un fluido perivitelino (FPV) cuyos componentes, en su mayoría, son sintetizados y secretados por una glándula accesoria del tracto reproductor de la hembra denominada glándula del albumen (Catalán, M. et al. 2006; Dreon, M. S. et al. 2003; Dreon, M. S. et al. 2002). Las proteínas presentes en este FPV, denominadas perivitelinas, están siendo activamente estudiadas por nuestro laboratorio en *P. canaliculata*, describiéndose además de su clásico rol nutricional, interesantes funciones relacionadas con la protección del embrión frente a factores abióticos y depredadores (Dreon, M. S. et al. 2010; Heras, H. et al. 2007). En este sentido, PcOvo, principal perivitelina de *P. canaliculata* cumple importantes funciones durante el desarrollo embrionario como fotoprotección, estabilización de moléculas antioxidantes e inhibición de proteasas (Dreon, M. S. et al. 2004; Heras, H. et al. 2007; Norden, D. A. 1972). Este rol como inhibidor de proteasas junto a su resistencia a proteasas digestivas y su gran estabilidad estructural a pHs ácidos sugieren la participación de esta perivitelina en un sistema de defensa anti-depredador limitando la digestión de los nutrientes del huevo (defensa antidigestiva) (Dreon, M. S. et al. 2010). Además, la perivitelina-2 (PcPV2) de *P. canaliculata*, es una neurotoxina con efecto letal sobre roedores (Dreon, M. S. et al. 2013; Heras, H. et al. 2008) lo que complementaría los efectos de PcOvo en este mecanismo de defensa contra depredadores de huevos. Por otro lado, existen registros del sistemático descarte de la glándula del albumen por depredadores de caracoles adultos como el gavilán caracolero (*Rostrhamus sociabilis*), sugiriendo que estas proteínas ya estarían activas en este órgano (Snyder, N. F. R. et al. 1983).
- En los últimos años hemos ampliado el estudio de estas proteínas a otras especies de Pomacea como *P. scalaris* y en el último año a *P. maculata*. La principal perivitelina de *P. scalaris* (PsSC) presenta importantes similitudes bioquímicas con PcOvo como una estructura oligomérica, alta glicosilación y un cofactor carotenoides (Ituarte, S. et al. 2008). Además, estas perivitelinas, al igual que PcOvo, es altamente estable frente a la temperatura y el pH y resisten una digestión gastrointestinal simulada. Desde el punto de vista funcional PsSC, a diferencia de PcOvo presenta una fuerte actividad hemaglutinante (Ituarte, S. et al. 2012), sugiriendo en esta especie un sistema de defensa contra depredadores de huevos algo diferente al de *P. canaliculata* aunque igualmente efectivo ya que tampoco posee depredadores en su ambiente natural.
- En síntesis podemos decir que las perivitelinas de Pomacea, al menos en las 2 especies estudiadas hasta el momento, son proteínas multifuncionales, que no sólo proveen de nutrientes al embrión, sino que además lo protegen de factores abióticos durante su desarrollo y forman parte de una compleja defensa que incluye proteínas antinutritivas, antidigestivas, neurotóxicas y aglutinantes, que contribuirían significativamente al notable éxito reproductivo de la especie. Así, las perivitelinas antes de ser el alimento del embrión, impedirían la adquisición de nutrientes e intoxicarían al depredador, una defensa poco común en la naturaleza, que abre nuevas perspectivas para estudios evolutivos y ecológicos de estrategias reproductivas.
- Un estudio estructural más detallado de estas perivitelinas podría ayudar a describir nuevas relaciones estructura-función de proteínas, no descritas en mamíferos. Por otro lado, dadas las interesantes funciones de PcOvo, PcPV2 y PsSC, este conocimiento no hace más que incrementar el potencial de estas perivitelinas como proteínas modelo y su potencial aplicabilidad biotecnológica y sanitaria.

Objetivos:

El objetivo general del proyecto es profundizar el conocimiento sobre la fisiología reproductiva de moluscos gasterópodos. En particular se pretende estudiar el rol de las perivitelinas en la estrategia reproductiva de estos moluscos empleando como modelo caracoles de interés económico-sanitario.

Para esto se propone:

1. Profundizar los estudios acerca de la actividad antinutritiva de PcOvo, estudiando a nivel histopatológico su efecto sobre el intestino de rata.
2. Estudiar el FPV *P. maculata*, una especie relacionada y con una estrategia reproductiva similar a *P. canaliculata* y *P. scalaris* caracterizando sus principales perivitelinas desde el punto de vista estructural y funcional.
3. Continuar con los estudios estructurales y funcionales de las perivitelinas de *P. scalaris*, analizando sus similitudes y diferencias con PcOvo y PcPV2.
4. Continuar con la caracterización bioquímica de la glándula de albumen de *P. canaliculata* y estudiar su toxicidad sobre potenciales depredadores de adultos.

Metodología:

1. Para estos estudios se realizarán bioensayos con ratas Wistar de 120g administrándoseles diariamente la proteína purificada en el agua de bebida (Ver detalles en (Dreon, M. S. et al. 2010)). Los estudios histopatológicos del intestino de los animales se realizarán mediante inmunohistoquímica, lectinahistoquímica y microscopía electrónica de barrido. Estos estudios se realizarán en colaboración con la Dra. Patricia Fernandez y el Dr. Eduardo Gimeno de la Cátedra de Patología General de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP.
2. La caracterización bioquímica del FPV de *P. maculata* se realizará empleando la metodología ya utilizada con éxito por nuestro laboratorio en estudios anteriores (Dreon, M. S. et al. 2003;Dreon, M. S. et al. 2002;Garín, C. F. et al. 1996;Ituarte, S. et al. 2008).
3. La metodología para este punto representa la ya empleada exitosamente en anteriores estudios en nuestro laboratorio (Dreon, M. S. et al. 2007;Dreon, M. S. et al. 2003;Dreon, M. S. et al. 2008;Dreon, M. S. et al. 2002;Frassa, M. V. et al. 2010;Heras, H. et al. 2008).
4. La determinación de la composición bioquímica de la glándula del albumen permitirá determinar su calidad alimenticia y contenido de energía como potencial fuente nutricia para un depredador. Las proteínas totales se determinarán colorimétricamente (Lowry, O. H. et al. 1951). La cuantificación de los lípidos totales se hará gravimétricamente (Bligh, E. G. et al. 1959). Finalmente, los glúcidos se cuantificarán siguiendo la técnica de Van Handel (1965). Se determinarán asimismo cenizas y contenido en calcio. Toda esta metodología se describe en Heras et al (1998).

La toxicidad de la glándula del albumen se evaluará empleando como modelo mamífero de potencial depredador vertebrado ratones BALB-C hembras de 5 a 6 semanas de edad, que sabemos son sensibles a las toxinas de los huevos. Se administrará citosol de glándula por vía intraperitoneal y oral, y se determinarán las LC50 96h. Estos datos se compararán con las previamente obtenidas empleando extractos de huevo siguiendo protocolos previamente establecidos en el laboratorio (Heras, H. et al. 2008).

Bibliografía

1. Albrecht,E.A., Carreño,N.B., and Castro-Vazquez,A., 1999. J. Mollus. Stud. 65, 241-250.
2. Bligh,E.G. and Dyer,W.J., 1959. Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.

3. Caldeira,R.L., Mendonça,C.L.G.F., Goveia,C.O., Lenzi,H.L., Graeff-Teixeira,C., Lima,W.S., Mota,E.M., Pecora,I.L., De Medeiros,A.M.Z., and Carvalho,O.D.S., 2007. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 887-889.
4. Carlsson,N.O.L., Kestrup,A., Martensson,M., and Nystrom,P., 2004. *Freshwater Biology* 49, 1269-1279.
5. Catalán,M., Dreon,M.S., Heras,H., Pollero,R.J., Fernández,S.N., and Winik,B., 2006. *Cell Tissue Res.* 324, 523-533.
6. Cazzaniga,N.J., 1990. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 84, 97-100.
7. Cowie,R.H., 2002. Apple snails (Ampullariidae) as agricultural pests: Their biology, impacts, and management. In: Baker,G.M. (ed.), *Molluscs as Crop Pests*, CABI, Wallingford, pp. 145-192.
8. Dreon,M.S., Ceolín,M., and Heras,H., 2007. *Arch. Biochem. Biophys.* 460, 107-112.
9. Dreon,M.S., Frassa,M.V., Ceolin,M., Ituarte,S., Qiu,J.W., Sun,J., Fernandez,P.E., and Heras,H., 2013. *PLoS One* 8, e63782.
10. Dreon,M.S., Heras,H., and Pollero,R.J., 2003. *Mol. Cell Biochem.* 243, 9-14.
11. Dreon,M.S., Ituarte,S., Ceolín,M., and Heras,H., 2008. *FEBS J.* 275, 4530.
12. Dreon,M.S., Ituarte,S., and Heras,H., 2010. *PLoS One* 5, e15059.
13. Dreon,M.S., Lavarías,S., Garín,C.F., Heras,H., and Pollero,R.J., 2002. *J. Exp. Zool.* 292, 323-330.
14. Dreon,M.S., Schinella,G., Heras,H., and Pollero,R.J., 2004. *Arch. Biochem. Biophys.* 422, 1-8.
15. Estebenet,A.L. and Cazzaniga,N.J., 1990. *J. Aquat. Plant Manage.* 28, 103-105.
16. Estebenet,A.L. and Martín,P.R., 2002. *Biocell* 26, 83-89.
17. Frassa,M.V., Ceolín,M., Dreon,M.S., and Heras,H., 2010. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 1492-1499.
18. Garín,C.F., Heras,H., and Pollero,R.J., 1996. *J. Exp. Zool.* 276, 307-314.
19. Hayes,K.A., Joshi,R.C., Thiengo,S.C., and Cowie,R.H., 2008. *Diversity and Distributions* 14, 701-712.
20. Heras,H., Dreon,M.S., Ituarte,S., and Pollero,R.J., 2007. *Comp. Biochem. Physiol. C* 146, 158-167.
21. Heras,H., Frassa,M.V., Fernández,P.E., Galosi,C.M., Gimeno,E.J., and Dreon,M.S., 2008. *Toxicon* 52, 481-488.
22. Heras,H., Garín,C.F., and Pollero,R.J., 1998. *J. Exp. Zool.* 280, 375-383.
23. Ituarte,S., Dreon,M.S., Ceolin,M., and Heras,H., 2012. *PLoS One* 7, e50115.
24. Ituarte,S., Dreon,M.S., Pollero,R.J., and Heras,H., 2008. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1441-1448.
25. López,M.A., Altaba,C.R., Andree,K.B., and López,V., 2010. *Tentacle* 18, 26-28.
26. Lowry,O.H., Rosenbrough,N.J., Farr,A.L., and Randall,R., 1951. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
27. Lv,S., Zhang,Y., Chen,S.R., Wang,L.B., Fang,W., Chen,F., Jiang,J.Y., Li,Y.L., Du,Z.W., and Zhou,X.N., 2009a. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 3, e520.
28. Lv,S., Zhang,Y., Liu,H.X., Hu,L., Yang,K., Steinmann,P., Chen,Z., Wang,L.Y., Utzinger,J., and Zhou,X.N., 2009b. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 3, e368.
29. Norden,D.A., 1972. *Comp. Biochem. Physiol. B* 42, 569-576.
30. Slom,T.J., Cortese,M.M., Gerber,S.I., Jones,R.C., Holtz,T.H., Lopez,A.S., Zambrano,C.H., Sufit,R.L., Sakolvaree,Y., Chaicumpa,W., Herwaldt,B.L., and Johnson,S., 2002. *N. Engl. J Med* 346, 668-675.
31. Snyder,N.F.R. and kale,H.W., 1983. *The auk* 100, 93-97.
32. Van Handel,E., 1965. *Anal. Biochem.* 11, 256-265.
33. Yusa,Y., 2001. *J. Mollus. Stud.* 67, 275-279.

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 21).
 - 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: ininvest@cic.gba.gov.ar (puntos 1 al 21), 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.

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.