

## INFORME DE AVANCE PROYECTOS DE INVESTIGACION 2013 - 2015

### 1- Datos del Proyecto - Código: 06/M064

**Denominación:** Procesos reproductivos y compuestos organoestañosos en la ampularia *Pomacea canaliculata*

**Director:** Alfredo CASTRO-VAZQUEZ

**Resumen:** *Pomacea canaliculata* es un caracol de agua dulce autóctono de nuestro país que ha alcanzado notoriedad internacional por su alta capacidad invasiva y además, por ser huésped intermediario de *Angiostrongylus cantonensis*, el agente causal de la meningitis eosinófila en humanos. En los últimos años, ha crecido su interés como un organismo modelo indicador de diferentes tóxicos presentes en el agua, particularmente de compuestos orgánicos conteniendo metales en su estructura como el tributilestaño (TBT). Durante los últimos años, nuestro laboratorio ha centrado su atención en diversos aspectos de la ecofisiología reproductiva de este animal (3 tesis defendidas, 1996, 2007, 2011) y hemos logrado sentar una base sólida sobre la organogénesis de los órganos reproductivos de esta especie dioica. El aparato reproductor del macho es un órgano complejo compuesto por diversos tejidos, destacándose la presencia de una vaina que forma un canal por donde circula el pene y con glándulas exocrinas y plausiblemente paracrinas. Por su parte, la organogénesis de estas estructuras se detiene en hembras adultas normales y prácticamente permanece como un rudimento durante toda su vida; sin embargo, en presencia de TBT se observa un efecto inductor de la organogénesis del rudimento copulatorio y además, un efecto spermicida sobre el receptáculo seminal de la hembra. Por tanto, en este proyecto proponemos avanzar con un estudio integral que incluye los posibles blancos y mecanismos que subyacen al efecto del TBT sobre las hembras de este animal. Son objetivos específicos conocer: a) la morfología interna del receptáculo seminal de la hembra, que es extraordinariamente compleja, y que es un órgano clave de la reproducción de esta especie por ser el lugar de acumulación de espermatozoides después de la copulación, y por ser además el lugar de la fertilización; 2) la interacción entre los compuestos organoestañosos y el desarrollo del rudimento copulatorio de la hembra, órgano que se desarrolla a los pocos días de la eclosión y que continúa creciendo aun después de la madurez sexual y 3) la interacción entre los compuestos organoestañosos y los ganglios neurales, lo que puede estar a la base del efecto inhibitorio de estos compuestos sobre el comportamiento sexual y el de oviposición.

---

**Objetivos:**

Nuestro objetivo general es continuar nuestros estudios en proyectos anteriores sobre el mecanismo de acción de los compuestos organoestañosos (y su agonista endógeno, el ácido 9-cis retinoico) sobre algunos procesos reproductivos de esta ampularia, los que podrían utilizarse como bioindicadores de contaminación del agua.

Nuestros objetivos específicos son:

1. Conocer la morfología interna del receptáculo seminal de la hembra, que es extraordinariamente compleja ([hallazgos preliminares de Catalán de Canelada, 2007](#)), y que es un órgano clave de la reproducción de esta especie por ser el lugar de acumulación de espermatozoides después de la copulación, y por ser además el lugar de la fertilización.
2. La interacción entre los compuestos organoestañosos y el desarrollo del rudimento copulatorio de la hembra, órgano que se desarrolla a los pocos días de la eclosión y que continúa creciendo aun después de la madurez sexual ([Gamarra-Luques et al., 2013](#); [Giraud-Billoud et al., 2013](#)).
3. La interacción entre los compuestos organoestañosos y los ganglios neurales, lo que puede estar a la base del efecto inhibitorio de estos compuestos sobre el comportamiento sexual y el de oviposición ([Giraud-Billoud et al., 2013](#)).

#### Referencias

Catalán de Canelada, N.M.Y. 2007. Aspectos morfológicos y funcionales del oviducto paleal de *Pomacea canaliculata* (Gastropoda, Prosobranchia). *Tesis de Doctorado*. Universidad Nacional de Tucumán.

Gamarra-Luques, C., Giraud-Billoud, M. & Castro-Vazquez, A. 2013. Reproductive organogenesis in the apple snail *Pomacea canaliculata* with reference to the effects of xenobiotics. *Journal of Molluscan Studies* **79**: 147-162.

Giraud-Billoud, M., Vega, I.A., Wuilloud, R.G., Clement, M.E. & Castro-Vazquez, A. 2013. Imposex and novel mechanisms of reproductive failure induced by tributyltin (TBT) in the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **32**: 2365-2371.

## 2 - Grado de Avance de los objetivos propuestos

Objetivo	% Avance
Objetivo 1: Conocer la morfología interna del receptáculo seminal de la hembra. XXX	50%
Objetivo 2: Evaluar la interacción entre los compuestos organoestañosos y el desarrollo del rudimento copulatorio de la hembra	100%
Objetivo 3: Estudiar la interacción entre los compuestos organoestañosos y los ganglios neurales.	50%
<b>Porcentaje de avance general del proyecto: 67% (media de los tres objetivos propuestos)</b>	<b>67%</b>

### 3 - Resultados Preliminares

El **primer objetivo específico** del proyecto, que involucra conocer la morfología interna del receptáculo seminal de la hembra se encuentra en un estado de avance del **50%**. El receptáculo seminal (RS) se encuentra parcialmente incluido en la región ventral del complejo glandular. Consta de una porción bulbosa y otra ductal curvada en U, revestidas por una pared fibromuscular gruesa. El bulbo del RS recibe la desembocadura del oviducto renal que atraviesa la cubierta muscular, describe un trayecto enrollado y comunica con un complejo sistema de sacos irregulares que se abren al ducto principal. El bulbo se encuentra dividido en dos porciones, una glandular y otra microvellositaria. Esta última es la que aloja a los espermatozoides densamente empaquetados, los cuáles se ubican orientados perpendicularmente respecto al epitelio superficial y que en nuestros estudios hemos identificado una disminución significativa de la población de espermatozoides en hembras que han sido expuestas a compuestos organoestañosos (TBT). El resto del RS está conformado por un ducto, que cuenta con una importante cresta longitudinal y una cubierta fibromuscular importante, que recibe la desembocadura de la bursa copulatrix en el punto que este se continúa con otra estructura de la glándula uterina, el ducto glandular de la cáscara. Dada la complejidad estructural del RS, hemos logrado reconstruir tridimensionalmente la estructura general del tracto femenino de esta ampullaria, y falta reconstruir, a menor escala, la región en que se produce la fertilización. El **segundo objetivo específico** del proyecto donde se proponía estudiar la interacción entre los compuestos organoestañosos y el desarrollo del rudimento copulatorio de la hembra ha sido completado en un **100%**. Durante esta etapa del estudio hemos podido observar que la administración intramuscular de disruptores endócrinos (EDs) a hembras juveniles mostró que aquellas expuestas a TBT y TPT presentaron mayor longitud del pene, aunque este efecto no fue significativo al compararlo con el grupo control. Asimismo, al analizar el aparato copulatorio completo (rudimento de la vaina peneana y pene), pudimos observar que los animales de los grupos control no presentaban desarrollo de la vaina peneana y que el pene era pequeño (<0,5mm), alojado dentro del saco peneano en formación, mientras que aquellos animales expuestos a EDs presentaron mayor desarrollo del aparato copulatorio que los controles, siendo este efecto más evidenciable ante la exposición a TBT y 9-cis-RA, y menor medida cuando se los expuso a TPT. A partir de estas observaciones se determinó el porcentaje de imposex de los animales, evidenciándose un porcentaje superior al 90% en aquellos expuestos a EDs, mientras que en aquellos no expuestos, el desarrollo fue menor al 10%. En un estudio previo observamos que la exposición de animales juveniles y adultos al TBT producía imposex en *P. canaliculata*, y por esto nos propusimos cuantificar este desarrollo en animales juveniles y evaluar la posible participación del RXR. Los resultados muestran que los índices que se aplican para medir estos parámetros son deficientes en etapas tempranas (mFPL), ya que las estructuras son muy pequeñas y no arrojan diferencias significativas, a pesar de que a la observación directa las estructuras se mostraban claramente más desarrolladas en hembras expuestas a EDs. Por esto consideramos que el uso de ejemplares juveniles como centinela de contaminación de agua requiere estandarizar nuevos índices específicos y sensibles que nos permitan diferenciar claramente aquellos animales expuestos a tóxicos de aquellos que no lo están. El **tercer objetivo específico** del proyecto busca evaluar la interacción entre los compuestos organoestañosos y los ganglios neurales. Este objetivo se encuentra en un estado de avance del **50%**, habiendo logrado primero la localización de los ganglios y el establecimiento de sus relaciones anatómicas mediante microdisecciones, las que en algún caso debieron ser apoyadas también por el análisis de cortes seriados. Posteriormente se hizo el procesamiento de imágenes para reconstrucción 3D de cada una de las estructuras nerviosas. El avance actual del proyecto nos ha permitido reconocer que *P. canaliculata* tiene un sistema nervioso organizado en pares de ganglios, como ocurre con variantes en todos los

gasterópodos y la mayoría de estos ganglios se encuentra en el hemocele perifaríngeo. El par más anterior, integrado por los ganglios cerebroides, se ubica en la base de los tentáculos, hacia arriba y a los lados del tubo oral, unidos contralateralmente por una gruesa comisura intercerebral, que pasa por encima del bulbo faríngeo. El segundo y el tercer par, integrados por los ganglios pedales y pleurales, respectivamente, forman parte de un conjunto ganglionar ubicado en la parte anterior y basal del hemocele perifaríngeo. Este conjunto, al cual se integra además el ganglio parietal derecho o “subintestinal” (parte del cuarto par ganglionar), lo designaremos como el complejo anterobasal. Este complejo es asimétrico, ya que no incluye al ganglio parietal izquierdo o “suprainestinal”. Los ganglios pedales y los pleurales se unen contralateralmente por las comisuras pedal y pleural, respectivamente, las que a su vez están parcialmente unidas entre sí por un quiasma. En cambio, y por su parte, el ganglio parietal izquierdo ha quedado separado del complejo anterobasal como resultado de la torsión, y ha sido el más difícil de ubicar mediante microdisecciones. Está ubicado hacia la región posterior del bulbo faríngeo, aproximadamente hacia el límite posterior de las glándulas salivares, pero sin inervarlas. Con frecuencia este ganglio queda incluido en la pared muscular izquierda que delimita este espacio, lo que dificulta su hallazgo. Los ganglios parietales izquierdo y derecho están unidos contralateralmente por la comisura parietal (o “suprainestinal”) que cruza diagonalmente por encima del bulbo faríngeo, inmediatamente por detrás de las glándulas salivares. Ipsilateralmente, el ganglio parietal izquierdo se une al ganglio pleural del mismo lado por el grueso conectivo de la zigoneuría. El par de ganglios viscerales también ha sido difícil de encontrar. Son ganglios pequeños y que están fusionados entre sí en la región anterior de la masa visceral, ubicados junto al pericardio y cercanos a la pared posterior de la cavidad paleal. Están unidos ipsilateralmente con ambos ganglios parietales, mediante conectivos delgados y tortuosos que atraviesan la masa de inserción del músculo columelar. Y dan origen a un manojo de nervios que se pierden en la masa visceral. Gracias al estudio realizado al momento y de acuerdo a la disposición y conexiones de los ganglios nos permitimos sugerir una hipótesis funcional según la cual los ganglios cerebroides se comportarían como analizadores/integradores de primer orden, que reciben información de distintos órganos sensoriales (como los de los tentáculos, ojos, otocisto y palpos), y podrían ejercer control sobre los ganglios pedales y pleurales a través de los conectivos propios. En cuanto a los ganglios pedales, puede hipotetizarse que son principalmente eferentes, inervando la musculatura del pie. En cambio, los ganglios pleurales también se comportarían como analizadores/integradores de primer orden, recibiendo información desde el sifón, la osfradía y el aparato copulatorio, y vehicularían la información hacia el ‘loop’ visceral conformado por los ganglios parietales y viscerales, que como analizadores/integradores de segundo orden controlarían principalmente las funciones viscerales. Ahora que hemos caracterizado el sistema ganglionar de este animal, pretendemos avanzar en el estudio de las respuestas de los ganglios a diferentes estímulos exógenos.

#### **4 - Dificultades Encontradas**

La complejidad estructural del receptáculo seminal demoró la reconstrucción de este órgano para su caracterización. Asimismo, el estudio de animales juveniles expuestos a distintos disruptores endócrinos tuvo como principal inconveniente que no hemos logrado establecer la mejor forma de medición del fenómeno de imposex, dado que los índices que clásicamente se utilizan para cuantificar su incidencia y severidad están estandarizados para adultos. En cuanto al estudio de los ganglios de esta especie, tuvimos dificultades para ubicar las estructuras involucradas, pero en la actualidad hemos logrado identificar todos sus componentes.

## 5 - Director

### 5.1 - Conocimiento de Idiomas

Idioma	Nivel de conocimiento
Inglés	Lee, habla y escribe

### 5.2 - Estudios de Posgrado

### 5.3 - Formación de Recursos Humanos

#### Becarios

Nombre y Apellido	Título	Organismo
Cristina Celeste Crocce	Topografía neuronal de Pomacea canaliculata. Setiembre 2013 – Setiembre 2014	Becas Estímulo a las Vocaciones Científicas, Consejo Interuniversitario Nacional

### 5.4 - Actividad desarrollada durante el primer año

Descripción de la actividad desarrollada

Planeamiento de experimentos; Interpretación de resultados de experimentos y guía para su realización; escritura de informes de becas, resúmenes para congresos y publicaciones.

**A - Codirector**

Nombre y Apellido	Estado	Satisfactorio	No Satisfactorio	¿Envió Informe de Avance?
<b>Maximiliano Germán GIRAUD-BILLOUD</b>	Activo			<b>Enviado!</b>

**B - De los integrantes del equipo de trabajo**

Integrante	Estado	Satisfactorio	No Satisfactorio	¿Envió Informe de Avance?
<b>Cristina Celeste CROCE</b>	Baja: 2015-05-13	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	No Enviado
<b>María Julieta LEIVA</b>	Baja: 2015-05-13	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	No Enviado
<b>Sergio Andrés Carminati</b>	Activo	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	No Enviado

## 6 - Transferencias Realizadas

### **Publicaciones:**

- Giraud-Billoud M, Castro-Vazquez A. A critical evaluation of the effect of organotins and a retinoid X-receptor agonist on the female copulatory apparatus of the invasive apple snail *Pomacea canaliculata*. En redacción.

### **Comunicaciones a congresos:**

- Giraud-Billoud M, Croce CC, Castro-Vazquez A. (POSTER) "Identity and location of the central neural ganglia in the apple snail *Pomacea canaliculata*" XXXI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo, Mendoza, Argentina. Diciembre 2013. *Biocell* 37:A81.
- Leiva MJ, Giraud-Billoud M, Castro-Vazquez, A. (FORO VIRTUAL) "Evaluación de la participación del receptor de retinoides X (RXR) en el desarrollo de imposex de *Pomacea canaliculata*". XIII Jornadas de Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas, UNCuyo. Mendoza, Argentina. Noviembre 2014.

## 7 - Financiamiento

**Destino:** Gastos varios del proyecto

**Institución:** CONICET

**Monto acordado:** 7500

**Destino:** gastos varios del proyecto

**Institución:** FONCYT-ANPCYT

**Monto acordado:** 7000