

Proyecto Resumen

Descripción del Proyecto

Denominación Defensas inmunitarias y contra el daño oxidativo en la ampularia *Pomacea canaliculata*

Fecha de Alta 2013-10-28 13:06:42

Palabras Clave hemocitos – células madres – esferoides 3D – reoxigenación – peroxidación lipídica – daño del proteoma

Actividad Investigación Básica

Resumen Técnico La ampularia *Pomacea canaliculata* es un gasterópodo de agua dulce que presenta diversas estrategias adaptativas para enfrentar diferentes estresores ambientales bióticos y abióticos. Las defensas inmunitarias de esta especie y su habilidad para tolerar períodos de actividad y quiescencia, se muestran como estrategias adaptativas que podrían dar cuenta de la gran capacidad invasora alrededor del mundo. *P. canaliculata* está asociada a numerosos simbiontes en su rango de distribución original, aunque sólo algunos pueden estar implicados en enfermedades humanas como dermatitis (urticaria de los nadadores) y, notablemente, la meningoencefalitis eosinofílica (provocada por el nemátodo *Angiostrongylus cantonensis*). Además de las barreras físicas contra los agresores (conchilla, tegumento), este animal está dotado de un sistema inmune innato compuesto de hemocitos, los cuales no sólo se encuentran en circulación, sino que frecuentemente infiltran diversos tejidos y órganos y además, son capaces de formar aglomerados esferoidales en el riñón y pulmón que participan en la defensa contra los agresores. Por otra parte, este animal es capaz de enfrentar dos ciclos de actividad-quiescencia (uno de estivación y otro de hibernación) que implican la alternancia de hipoxia y reoxigenación, y la participación de defensas antioxidantes y de chaperonas moleculares; aunque el estado de conocimiento bioquímico y proteómico de la estivación ha avanzado substancialmente, la hibernación recién ha comenzado a estudiarse (Sectyp-UNCuyo, 2011-2013). El abordaje de ambas estrategias de defensa de esta ampularia se hará a través de los siguientes objetivos específicos: (a) caracterizar las células troncales comprometidas con linaje/s hemocitario/s, (b) investigar la participación de las diferentes barreras

orgánicas *in vivo* (riñón y pulmón) e *in vitro* (agregados de hemocitos en cultivo) frente al desafío de antígenos bacterianos (lipolisacárido) y parasitarios (*A. cantonensis*, en colaboración con los Dres. Alessandra Morassutti y Carlos Graeff-Teixeira, de la Pontificia Universidade de Rio Grande do Sul, PUCRS) y, (c) profundizar el estudio de las diferentes defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas durante el ciclo actividad-hibernación.

**Estado Actual
de
Conocimientos
del Tema**

La ampularia *Pomacea canaliculata* es un gasterópodo nativo de la cuenca del Plata ([Hayes et al., 2012](#)) que ha mostrado una notable capacidad invasora como plaga de arrozales y otros cultivos inundados, adaptándose con facilidad a nuevas regiones, que hoy incluyen noreste de la India, Japón, sur de China y Estados Unidos (principalmente Florida y Hawaii) ([Rawlings et al., 2007](#); [Hayes et al., 2008](#)). Recientemente esta especie (y/o una congénérica, *P. maculata*) ha invadido el delta del Ebro, importante zona arrocera de España ([Oscoz et al., 2010](#)) y curiosamente, pero refirmando su extraordinaria capacidad invasora, se la ha encontrado también en Siberia, en medio de la nieve, pero habitando una laguna que es parte del sistema refrigerante de una estación eléctrica termonuclear ([Yanygina et al., 2010](#)).

Esta capacidad adaptativa se basa fundamentalmente en algunas de sus características ecofisiológicas, como el potencial reproductivo y la resistencia a agresores microbianos y a cambios drásticos del ambiente. Estos dos últimos aspectos serán abordados en este proyecto.

Defensas inmunitarias: *P. canaliculata* está asociada con una pléyade de organismos epi- y endosimbióticos en su ámbito de distribución original ([Vega et al., 2006](#)), desde bacterias a metazoos, muchos de los cuales parecen ser comensales, pero algunos de los cuales la benefician ([Vega et al., 2012](#); [Godoy et al., 2013](#); [Dellagnola et al., enviado](#)). El delicado equilibrio entre *self* y *non-self* sería mantenido por los hemocitos, células que cumplen funciones análogas a las del sistema inmune innato de los vertebrados, es decir, fagocitosis, degradación enzimática intracelular de patógenos, generación de especies reactivas de oxígeno y liberación de sustancias antimicrobianas ([Ottaviani, 1991](#); [Martin et al., 2007](#)) mediante degranulación holocrina y merocrina: estos hemocitos han sido recientemente caracterizados ([Accorsi et al., 2013](#); [Cueto et al., 2013](#); [Cueto et al., enviado](#)).

También en relación a las defensas hemocitarias, es importante destacar que *P. canaliculata* en China, es decir fuera de su ámbito de distribución original, se ha asociado como huésped intermediario alternativo con el nemátodo *Angiostrongylus cantonensis*, agente etiológico de la meningoencefalitis eosinofílica, enfermedad que puede ser invalidante y aun mortal ([Lv et al., 2009](#)). El parásito se ha dispersado fuera de China y ya se encuentra en Brasil ([Thiengo et al., 2013](#)), por lo que su asociación a las extensas poblaciones de *P. canaliculata* en nuestro país puede ser inminente.

Defensas contra el daño oxidativo: esta ampularia debe enfrentar cambios

drásticos de la disponibilidad de agua, en hábitats que se desecan ocasional o estacionalmente. Cuando esto ocurre, se entierran en el barro del fondo, cierran su opérculo y entran en un estado hipometabólico conocido como estivación. Este fenómeno fue observado por primera vez en esta especie por el viajero y naturalista francés Alcide d'Orbigny (1847) y ha sido recientemente estudiado por nosotros (Giraud-Billoud et al., 2011; Giraud-Billoud et al., 2013). Una situación diferente es la hibernación, que implica también la entrada en un estado hipometabólico, pero que ocurre en respuesta al descenso de la temperatura del agua. Si bien el ciclo de actividad-hibernación ha sido el objeto de estudios relacionados al desarrollo de la resistencia al frío (Matsukura et al., 2009; Wada & Matsukura, 2011), los mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo y el daño tisular no han sido estudiados (salvo un estudio preliminar nuestro, Giuffrida et al., 2013) y son significativos por la importancia de este ciclo ecofisiológico.

Referencias

- Accorsi, A., Bucci, L., De Eguileor, M., Ottaviani, E. & Malagoli, D. 2013. Comparative analysis of circulating hemocytes of the freshwater snail *Pomacea canaliculata*. *Fish & Shellfish Immunology* **34**: 1260-1268.
- Cueto, J.A., Vega, I.A. & Castro-Vazquez, A. 2013. Multicellular spheroid formation and evolutionary conserved behaviors of apple snail hemocytes in culture. *Fish & Shellfish Immunology* **34**: 443-453.
- Cueto, J.A., Rodriguez, C., Vega, I.A. & Castro-Vazquez, A. enviado. Hemocytes from the circulation and kidney islets of the apple snail *Pomacea canaliculata* after microbial exposure *Fish & Shellfish Immunology*.
- D'Orbigny, A. 1847 Voyage dans l'Amérique Méridionale. In: Vol. 5. Mollusques), pp. 711. C.P. Bertrand, Paris.
- Dellagnola, F.A., Koch, E., Castro-Vazquez, A. & Vega, I.A. enviado. Plastid 16S rRNA gene and maternal transmission of a unique endosymbiont of the apple snail *Pomacea canaliculata*.
- Giraud-Billoud, M., Abud, M.A., Cueto, J.A., Vega, I.A. & Castro-Vazquez, A. 2011. Uric acid deposits and estivation in the invasive apple-snail, *Pomacea canaliculata*. *Comparative & Biochemical Physiology Part A* **158**: 506-512.
- Giraud-Billoud, M., Vega, I.A., Rinaldi Tosi, M.E., Abud, M.A., Calderón, M.L. & Castro-Vazquez, A. 2013. Antioxidant and molecular chaperone defenses during estivation and arousal in the South American apple-snail *Pomacea canaliculata*. *Journal of Experimental Biology* **216**: 614-622.
- Godoy, M.S., Castro-Vazquez, A. & Vega, I.A. 2013. Endosymbiotic and host proteases in the digestive tract of the invasive snail *Pomacea canaliculata*: Diversity, origin and characterization. *PLoS One* **8**: e66689.
- Hayes, K.A., Joshi, R.C., Thiengo, S.C. & Cowie, R.H. 2008. Out of South

- America: multiple origins of non native apple snails in Asia. *Diversity and Distributions* **14**: 701-712.
- Hayes, K.A., Cowie, R.H., Thiengo, S.C. & Strong, E.E. 2012. Comparing apples to apples: clarifying the identities of two highly invasive Neotropical Ampullariidae. *Zoological Journal of the Linnean Society* **166**: 723-753.
- Lv, S., Zhang, Y., Liu, H.X., Hu, L., Yang, K., Steinmann, P., Chen, Z., Wang, L.Y., Utzinger, J. & Zhou, X.N. 2009. Invasive snails and an emerging infectious disease: results from the first national survey on *Angiostrongylus cantonensis* in China. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **3**: e368.
- Martin, G.G., Oakes, C.T., Tousignant, H.R., Crabtree, H. & Yamakawa, R. 2007. Structure and function of haemocytes in two marine gastropods, *Megathura crenulata* and *Aplysia californica*. *Journal of Molluscan Studies* **73**: 355-365.
- Matsukura, K., Tsumuki, H., Izumi, Y. & Wada, T. 2009. Physiological response to low temperature in the freshwater apple snail, *Pomacea canaliculata* (Gastropoda: Ampullariidae). *Journal of Experimental Biology* **212**: 2558.
- Oscoz, J., Tomás, P. & Durán, C. 2010. Review and new records of non-indigenous freshwater invertebrates in the Ebro River basin (Northeast Spain). *Aquatic Invasions* **5**: 263-284.
- Ottaviani, E. 1991. Tissue distribution and levels of natural and induced serum lysozyme immunoreactive molecules in a freshwater snail. *Tissue and Cell* **23**: 317-324.
- Rawlings, T.A., Hayes, K.A., Cowie, R.H. & Collins, T.M. 2007. The identity, distribution, and impacts of non-native apple snails in the continental United States. *BMC Evolutionary Biology* **7**: 97.
- Thiengo, S.C., De Oliveira Simões, R., Fernandez, M.A. & Maldonado Jr., A. 2013. *Angiostrongylus cantonensis* and Rat Lungworm Disease in Brazil. *Hawai'i Journal of Medicine & Public Health* **72**: 18-23.
- Vega, I.A., Damborenea, M.C., Gamarra-Luques, C., Koch, E., Cueto, J.A. & Castro-Vazquez, A. 2006. Facultative and obligate symbiotic associations of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Biocell* **30**: 367-375.
- Vega, I.A., Arribére, M.A., Almonacid, A.V., Ribeiro Guevara, S. & Castro-Vazquez, A. 2012. Apple snails and their endosymbionts bioconcentrate heavy metals and uranium from contaminated drinking water. *Environmental Science and Pollution Research* **19**: 3307-3316.
- Wada, T. & Matsukura, K. 2011. Linkage of cold hardiness with desiccation tolerance in the invasive freshwater apple snail, *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda: Ampullariidae). *Journal of Molluscan Studies*.
- Yanygina, L., Kirillov, V. & Zarubina, E. 2010. Invasive species in the biocenosis

**Formulación y
Fundamentación
del Problema a
Investigar**

1. Defensas inmunitarias: Como en todos los invertebrados que han sido estudiados, los hemocitos de esta ampularia cumplirían sus funciones patrullando la circulación hemolinfática y los tejidos, pero en esta ampularia, lo hacen además estableciendo dos barreras orgánicas a los invasores, el riñón y el pulmón (Rodríguez et al., 2012), órganos que están interpuestos de modo diverso en la circulación, ya que el riñón filtra principalmente la hemolinfa efluente de la masa cefalopodal, mientras que el pulmón filtra principalmente el efluente de la cavidad del manto y de la masa visceral (Andrews, 1965). Otro aspecto interesante es que los hemocitos de esta especie tienden a formar grandes acúmulos esféricos (~70µ), que hemos observado tanto *in vivo* (Rodríguez et al., 2012) como *in vitro* (Cueto et al., 2013) y en los que los agresores quedaría englobados. Consideramos que la formación de esferoides *in vitro* puede utilizarse como un modelo adecuado de las interacciones que ocurren *in vivo*.

2. Defensas contra el daño oxidativo: Como ocurre en patologías humanas (Halliwell & Gutteridge, 1989; Young & Woodside, 2001) la mayor agresión a la fisiología de este animal no es producida por la hipoxia que acompaña al hipometabolismo, sino por la formación de especies reactivas del oxígeno durante la reactivación metabólica a la salida del estado hipometabólico. En estudios recientes hemos descrito un conjunto de defensas enzimáticas y no enzimáticas que se ponen en juego durante la reactivación posterior a la estivación (Giraud-Billoud et al., 2011; Giraud-Billoud et al., 2013). Estudios no publicados (Giuffrida et al., 2013) sugieren que los mecanismos de defensa actuantes a la salida de la hibernación pueden ser semejantes a los de la salida de la estivación.

Referencias

Andrews, E.B. 1965. The functional anatomy of the mantle cavity, kidney and blood system of some pilid gastropods (Prosobranchia). *Journal of Zoology* 146: 70-94.

Cueto, J.A., Vega, I.A. & Castro-Vazquez, A. 2013. Multicellular spheroid formation and evolutionary conserved behaviors of apple snail hemocytes in culture. *Fish & Shellfish Immunology* 34: 443-453.

Giraud-Billoud, M., Abud, M.A., Cueto, J.A., Vega, I.A. & Castro-Vazquez, A. 2011. Uric acid deposits and estivation in the invasive apple-snail, *Pomacea canaliculata*. *Comparative & Biochemical Physiology Part A* 158: 506-512.

Giraud-Billoud, M., Vega, I.A., Rinaldi Tosi, M.E., Abud, M.A., Calderón, M.L. &

Castro-Vazquez, A. 2013. Antioxidant and molecular chaperone defenses during estivation and arousal in the South American apple-snail *Pomacea canaliculata*. *Journal of Experimental Biology* **216**: 614-622.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. 1989. *Free radicals in biology and medicine*. Clarendon Press (Oxford and New York).

Rodríguez, C., Vega, I.A., Cueto, J.A. & Castro-Vazquez, A. 2012. Hemocyte spheroidal aggregates in the kidney and lung of the apple-snail (*Pomacea canaliculata*) after an immune challenge. *Biocell* **36**.

Young, I. & Woodside, J. 2001. Antioxidants in health and disease. *Journal of Clinical Pathology* **54**: 176.

Objetivos

1. Defensas inmunitarias:

1.1. Investigar la presencia de células madre (progenitoras hemocitopoyéticas o mesenquimales) circulantes.

1.2. Investigar el rol de las distintas barreras orgánicas en la respuesta a antígenos (bacterianos y de *A. cantonensis*).

1.3. Investigar la formación *in vitro* de esferoides en respuesta a los antígenos precedentes.

2. Defensas contra el daño oxidativo:

2.1. Completar el estudio de la participación de defensas enzimáticas (CAT, SOD) y no enzimáticas (ácido úrico, glutatión reducido) durante el ciclo actividad-hibernación.

2.2. Estudiar la participación de chaperonas moleculares (Hsc70, 73 kDa; Hsp70, 72 kDa y Hsp90 durante el ciclo de actividad-hibernación.

Hipótesis de Trabajo

1. Defensas inmunitarias:

1.1. Existen células madre (progenitoras hemocitopoyéticas o mesenquimales) circulantes en la ampullaria *P. canaliculata*.

1.2. Los hemocitos reaccionan a los desafíos inmunológicos con la formación de esferoides 3D.

1.3. Los sitios principales de formación de esferoides son el riñón y el pulmón.

1.4. Los esferoides formados en los cultivos primarios de hemocitos son un modelo adecuado de la reacción que se produce *in*

vivo.

2. Defensas contra el daño oxidativo:

Las defensas puestas en juego a la salida de la hibernación son semejantes a las de la salida de la estivación.

Metodología

1.1. Animales: Se utilizará una cepa de cultivo de *Pomacea canaliculata*, originaria del Lago del Rosedal (Palermo, Buenos Aires) que hemos utilizado en estudios anteriores. Los animales son mantenidos a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, con un fotoperíodo de 14 horas de luz y 10 hs de oscuridad, y son alimentados con una dieta mixta consistente en lechuga, alimento balanceado para peces, huevos de ampullaria desecados y triturados, y papel.

1.2. Microscopía óptica y electrónica: Para microscopía óptica, las muestras de tejido se fijarán en líquido de Bouin diluido, serán deshidratadas e incluidas en parafina/resina (Histoplast[®]), para luego teñirlas con hematoxilina de Harris-eosina, hematoxilina férrica de Heindenhain o un tricrómico (Nuclear Fast Red, Alcian Blue y eosina). El análisis de imágenes se hará mediante el sistema Image Pro-Plus 4.1[®] (Media Cybernetics, Silver Spring, MA, USA). Se obtendrán micrografías digitales con un microscopio Nikon 80i. Para microscopía electrónica de transmisión, la fijación se hará en líquido de Karnovsky, seguido de un tratamiento con osmio-ferrocianuro de potasio e inclusión en Spurr. Para microscopía electrónica de barrido, las muestras serán deshidratadas por la metodología de punto crítico, y doradas para su observación.

1.3. Citometría de flujo: Las muestras examinadas con el citómetro FACS Aria III (BD Bioscience, California-USA) serán excitadas con una fuente láser de argón a 488 nm y los parámetros del instrumento establecidos para capturar la señales de fluorescencia por tamaño (FSC=forward light scatter), complejidad interna (SSC=side light scatter), como así también, a distintos marcadores específicos. En todos los casos se adquirirán al menos 20000 eventos por muestra y luego serán analizadas con los softwares Summit 4.3 y Diva. Los medios y buffers que se utilicen serán ajustados a 140 mOsm (Cueto et al., 2011) y luego filtrados a través de poros de 0,2 μm .

1.4. Cultivo primario de hemocitos: Se realizará según el método de Cueto et al. (2013) a partir de hemocitos circulantes “mixtos” y a partir de las poblaciones separadas mediante citometría de flujo y ‘cell sorting’, y que hemos identificado como agranulocitos, hialinocitos y granulocitos (Cueto et al., enviado).

1.5. Respuestas a desafíos antigénicos: se evaluará la respuesta de formación de esferoides hemocitarios en respuesta a antígenos de *Escherichia coli* (lipopolisacárido, LPS) y de *A. cantonesis* (antígeno 31 kDa, Morassutti et al., 2013) tanto *in vivo* como *in vitro*. Para los experimentos *in vivo* los antígenos se administrarán intrapodalmente o en la masa visceral, y la reacción se

explorará histológicamente en el riñón y el pulmón (los controles serán inyectados con vehículo). Para los experimentos *in vitro*, los hemocitos se cultivarán en ausencia o presencia de los antígenos, y la formación de esferoides se cuantificará como en Cueto et al. (2013)

1.6. Caracterización de las células madre en la circulación: El cultivo *in vitro* de hemocitos tomados de la circulación ha mostrado cierta actividad proliferativa (Cueto et al., 2013), que sugiere la existencia de una pequeña población circulante de células madre (mesenquimales y/o hemocitopoyéticas). Aquí exploraremos esta población por la determinación de la proporción de células en ciclo y en quiescencia (mediante yoduro de propidio y naranja de acridina, respectivamente), la actividad metabólica mitocondrial (mediante el colorante catiónico JC-1), la capacidad de eflujo de tóxicos (exclusión del colorante Hoechst 33342), así como el potencial proliferativo de los hemocitos (ensayo CFSE y captación de BrdU). Además, pondremos un modelo *in vivo* de tratamiento de los animales con 5-fluoruracilo (droga que interfiere con los procesos de biosíntesis de DNA y RNA o en su incorporación) para selección de células madre (resistentes al tratamiento por su baja actividad mitótica) y posterior rescate de los animales tratados con 5-FU con el trasplante de células madre de animales sanos. Nuestro modelo supone que la administración de hemocitos circulantes (conteniendo una proporción de células madre) disminuirá el porcentaje de mortalidad de animales tratados con 5-FU, que las células madre se alojarán en los nichos para su división y diferenciación (probablemente el riñón), y que la población de hemocitos circulantes recuperará valores normales.

1.7. Respuesta a la reoxigenación: Nuestros estudios anteriores han tenido por objeto las respuestas al estrés oxidativo en el ciclo de actividad-estivación (Giraud-Billoud et al., 2011; Giraud-Billoud et al., 2013). En el presente proyecto queremos completar un estudio no publicado (Giuffrida et al., 2013) que sugiere la actuación de mecanismos semejantes en el ciclo de actividad-hibernación.

1.7.1. *Defensas enzimáticas y no enzimáticas*: Estudiaremos el daño tisular durante la hibernación y la reoxigenación posterior mediante la determinación de peroxidación lipídica (TBARs) y la cuantificación de antioxidantes totales. Además estudiaremos la defensa específica por antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos (SOD, CAT, GSH, ácido úrico/alantoína), mediante métodos colorimétricos, como ya lo hemos hecho en el ciclo de actividad-estivación (Giraud-Billoud et al., 2011; Giraud-Billoud et al., 2013).

1.7.2. *Chaperonas moleculares*: La detección de las Hsp70 constitutiva (Hsc70, 73 kDa) e inducible (Hsp70, 72 kDa) y Hsp90 se realizará mediante Western blot bajo condiciones previamente descritas (Giraud-Billoud et al., 2013). Los anticuerpos primarios serán identificados usando IgG anti-ratón (obtenida en cabra) conjugados con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) y posteriormente detectadas con un sistema de

quimioluminiscencia. En todos los casos, la semicuantificación por densitometría se realizará usando el software de análisis de imágenes de NIH (ImageJ). Los cambios en la expresión tisular de cada una de las Hsp serán normalizadas por las unidades de β -tubulina estudiadas.

Referencias

Cueto, J.A., Vega, I.A. & Castro-Vazquez, A. 2013. Multicellular spheroid formation and evolutionary conserved behaviors of apple snail hemocytes in culture. *Fish & Shellfish Immunology* **34**: 443-453.

Giraud-Billoud, M., Abud, M.A., Cueto, J.A., Vega, I.A. & Castro-Vazquez, A. 2011. Uric acid deposits and estivation in the invasive apple-snail, *Pomacea canaliculata*. *Comparative & Biochemical Physiology Part A* **158**: 506-512.

Giraud-Billoud, M., Vega, I.A., Rinaldi Tosi, M.E., Abud, M.A., Calderón, M.L. & Castro-Vazquez, A. 2013. Antioxidant and molecular chaperone defenses during estivation and arousal in the South American apple-snail *Pomacea canaliculata*. *Journal of Experimental Biology* **216**: 614-622.

Morassutti, A.L., Perelygin, A., Levert, K., Lin, S.-C., Lee, Y.-M., Da Silva, A.J., Wilkins, P.P. & Graeff-Teixeira, C. 2013. Expression of Recombinant Antigenic Proteins from *Angiostrongylus cantonensis*: A Brief Report. *Hawai'i Journal of Medicine & Public Health* **72**: 58.

Resultados Esperados

Con este proyecto esperamos:

1. Encontrar células madre circulantes en *P. canaliculata*, pero que a la vez se anclan en ciertos tejidos que adquieren entonces el carácter de hemopoyéticos. Entre ellos los más notables serán los islotes hemocitarios renales. También esperamos encontrar que la exposición a antígenos (bacterianos y de *A. cantonensis*) promueve la formación de esferoides hemocitarios en el riñón y en el pulmón, y que lo mismo podrá ser repetido *in vitro*.
2. Que la ampularia manifieste una poderosa respuesta antioxidante y de chaperonas moleculares frente a la reoxigenación posterior a la hibernación.

Inglés (Título)

Defences against immune challenges and oxidative damage in the apple snail *Pomacea canaliculata*

Inglés (Descripción)

The apple snail *Pomacea canaliculata* is a freshwater gastropod presenting several adaptative strategies to cope biotic and abiotic environmental stressors. The immune defenses and the ability to tolerate periods of activity-quiescence may account for the invasive capacity of this snail. *P. canaliculata* is associated to numerous symbionts in its original range, but only some are involved in

human diseases such as dermatitis ('swimmers itch') and, notably, to eosinophilic meningitis (provoked by the nematode *Angiostrongylus cantonensis*). Beyond the physical barriers against aggressors (shell, integument), this animal is endowed with an innate immune system composed of hemocytes, which are both in the circulation and as infiltrating cells in several tissues and organs, and are able to form spheroidal aggregates in the kidney and the lung. Besides that, this apple snail is able to cope with the stress of two ecophysiological cycles of activity-quiescence (estivation, hibernation) which imply sequential hypoxia and reoxygenation, with the involvement of antioxidant defenses and molecular chaperones: even though our knowledge of the biochemical and proteomic mechanisms of estivation has significantly advanced, those of hibernation have only been preliminary studied (SECTyP-UNCuyo, 2011-2013). These defenses will be approached through the following specific objectives: (a) characterization of stem cells committed to the hemocyte lineage/s, (b) investigation of the involvement of the different organ barriers *in vivo* (kidney and lung) and *in vitro* (hemocyte aggregates in culture), and their response to challenge by bacterial (lipopolysaccharide) and parasite antigens (*A. cantonensis*, in collaboration with Drs. Alessandra Morassutti y Carlos Graeff-Teixeira, Pontificia Universidade de Rio Grande do Sul, PUCRS) and (c) the completion of the study of enzymatic and non-enzymatic antioxidant defenses during the activity-hibernation cycle.

Inglés (Palabras Clave) Hemocytes – stem cells – 3D spheroids – reoxygenation – lipid peroxidation – proteome damage

Ubicación Académica

Unidad Académica	Unidad Ejecutora	Teléfono	e-mail
Ciencias Médicas	Instituto de Fisiología	4135000 int. 2015	

Transferencia y Beneficiarios

Formación de RRHH:

Cristian RODRÍGUEZ, tesista de doctorado, PROBIOL, UNCuyo.

Pablo M. GIUFFRIDA, estudiante de grado, becario CIN.

Transferencia:

Consideramos que los ámbitos propios de la transferencia de un proyecto de investigación básica son:

- (a) transferencia a la docencia de grado y postgrado.
- (b) publicaciones en revistas de circulación internacional.
- (c) comunicaciones en jornadas y reuniones científicas.

Nos proponemos ejercer la transferencia en todos estos ámbitos.

Equipo de Trabajo

Director Maximiliano Germán GIRAUD-BILLOUD [Editar](#)

Nombre	Maximiliano Germán GIRAUD-BILLOUD
CUIL	20-28411019-7
Tipo y Número de Documento	DNI: 28411019
Domicilio Particular	Las Encinas 3857, MH2 - D1, Guaymallén, Mendoza
e-mail	magiraudbilloud@gmail.com
Fecha de Nacimiento	1980-08-31
Teléfono Laboral	413-5000, int. 2715
Teléfono Particular	153017521
Título Académico	Doctor en Medicina, Doctor en Ciencias Biológicas (orientación Fisiología), Especialista en Docencia Universitaria.
Horas Semanales Dedicadas a la Investigación	10 horas
Cargo	Profesor Adjunto
Institución	Universidad Nacional de Cuyo
Lugar de Trabajo	Instituto de Fisiología
Categoría de Investigador	V
Grado Académico	Doctorado
Disciplina Profesional	Médicos

Libros Publicados

-----.

Capítulos de Libros Publicados

-----.

Publicaciones en Revistas

1. Hayes, K.A., Burks, R., Castro-Vazquez, A., Darby, P.C. , Heras, H., Martín, P.R., Qiu, J.-W., Thiengo, S.C., Vega, I.A., Wada, T., Yusa, Y., Burela, S., Cadierno, M.P., Cueto, J.A., Dellagnola, F.A., Dreon, M., Frassa, V.M., **Giraud-Billoud, M., Godoy, M.S.**, Ituarte, S., Koch, E., Matsukura, K., Pasquevich, M.Y., Rodriguez, C., Saveanu, L., Seuffert, M.E., Strong E.M, Sun, J., Tamburi, N.E., Tiecher, M.J., Turner, R.L., Valentine-Darby, P., Cowie, R.H. *Malacologia*. En Prensa
2. Ezquer, Marcelo; Arango-Rodriguez, Martha; **Giraud-Billoud, Maximiliano** & Ezquer, Fernando. "Mesenchymal stem cell therapy in type 1 Diabetes Mellitus and its main complications: From experimental findings to clinical practice". *Journal of Stem Cell Research & Therapy*. 4:8. doi: 10.4172/2157-7633.1000227, 2014.
3. Bigatti, Gregorio; **Giraud-Billoud, Maximiliano**; Vega, Israel A.; Penchaszadeh, Pablo E. & Castro-Vazquez, Alfredo. "A comparative perspective on embryonic development in the Patagonian red snail *Odontocymbiola magellanica* (Neogastropoda: Volutidae): Morphology and biochemistry". *Zoologischer Anzeiger*. Vol. 253 (5) pp 372-381. doi: 10.1016/j.jcz.2014.03.001, 2014.
4. **Giraud-Billoud, Maximiliano**; Vega, Israel A.; Wuilloud, Rodolfo G.; Clément María E. & Castro-Vazquez Alfredo. "Imposex and novel mechanisms of reproductive failure induced by tributyltin (TBT) in the freshwater snail *Pomacea canaliculata*". *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 32 (10) pp 2365-2371. doi: 10.1002/etc.2310, 2013.
5. Gamarra-Luques, Carlos; **Giraud-Billoud, Maximiliano**; & Castro-Vazquez A. "Reproductive organogenesis in the apple snail *Pomacea canaliculata*". *Journal of Molluscan Studies*. 79: 147-162. 2013. doi:10.1093/mollus/eyt011. 2013.
6. **Giraud-Billoud Maximiliano**, Vega Israel A., Rinaldi Tosi Martín E., Abud María A., Calderón María L., Castro-Vazquez Alfredo. "Antioxidant and molecular chaperone defenses during estivation and arousal in the South American apple-snail *Pomacea canaliculata*". *Journal of Experimental Biology*. 216: 614-622. doi:10.1242/jeb.075655. 2013.
7. **Giraud-Billoud, Maximiliano**; Gamarra-Luques, Carlos & Castro-Vazquez, Alfredo. "Functional anatomy of male copulatory organs of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae)". *Zoomorphology*. 132: 129-143. doi: 10.1007/s00435-012-0183-y. 2013.
8. **Giraud-Billoud, Maximiliano**; Abud, María A.; Cueto, Juan A; Vega, Israel A. & Castro-Vazquez, Alfredo. "Uric acid deposits and estivation in the invasive apple snail, *Pomacea canaliculata*". *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*. 151: 506-512. doi: 10.1016/j.cbpa.2010.12.012, 2011.
9. Cueto, Juan A.; **Giraud-Billoud, Maximiliano**; Vega, Israel A. & Castro-Vazquez, Alfredo. "Haemolymph plasma constituents of the invasive snail *Pomacea canaliculata* (ARCHITAENIOGLOSSA, AMPULLARIIDAE)". *Molluscan Research*. 31 (1): 57-60, 2011.
10. Bigatti, Gregorio; **Giraud-Billoud, Maximiliano**; Vega, Israel A.; Penchaszadeh Pablo E. & Castro-

Vazquez, Alfredo. "The calcareous egg capsule of the patagonian neogastropod *Odontocymbiola magellanica*: Morphology, secretion and mineralogy". *Journal of Molluscan Studies*, Vol 76 (3): 279-288, doi:10.1093/mollus/eyq006, 2010.

11. **Giraud-Billoud, Maximiliano**; Koch, Eduardo; Vega, Israel A.; Gamarra-Luques, Carlos & Castro-Vazquez, Alfredo. "Urate cells and tissues in the southern american apple snail *Pomacea canaliculata*". *Journal of Molluscan Studies*, Vol. 74 pp 259-266, 2008.
12. Vega, Israel A.; **Giraud-Billoud, Maximiliano**; Koch, Eduardo; Gamarra-Luques, Carlos & Castro-Vazquez, Alfredo. "Uric acid accumulation within intracellular crystalloid corpuscles of the midgut gland in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae)"; *Veliger*, Vol. 48 (4) pp 276-283, 2007.

Experiencia Previa

Ha sido becario de posgrado y de postdoctorado del CONICET (2006-2013). Es Investigador Asistente del CONICET (desde 2015). En la Universidad ha sido Ayudante ad-honorem (2001), Ayudante de 2° (2002-2004) de 1° de Fisiología (2004-2006), Jefe de Trabajos Prácticos de Fisiología (2006-2011), Profesor Adjunto de Fisiología (2011-2013). Ha contribuido a distintas áreas de la biología de *Pomacea canaliculata* (Ampullariidae).

Codirector Israel Anibal Vega

Nombre	Israel Anibal Vega
CUIL	20-23368600-0
Tipo y Número de Documento	DNI: 23368600
Domicilio Particular	Barrio Cementista II, Mz:22, C:18. Las Heras
e-mail	israelvega7@gmail.com
Fecha de Nacimiento	1973-04-28
Teléfono Laboral	4135000 int. 2715
Teléfono Particular	153010084
Título Académico	Doctor en Ciencias Biológicas (orientación Fisiología)
Horas Semanales Dedicadas a la Investigación	10 horas
Cargo	Profesor adjunto
Institución	Universidad Nacional de Cuyo

Lugar de Trabajo	Instituto de Fisiología
Categoría de Investigador	III
Grado Académico	Doctorado
Disciplina Profesional	Bioquímicos
Grado de Formación	Investigador

Libros Publicados

Capítulos de Libros Publicados

Publicaciones en Revistas

- GODOY, Martín S; CASTRO-VAZQUEZ, Alfredo; **VEGA, Israel A.** (2013) "Endosymbiotic and host proteases in the digestive tract of the invasive snail *Pomacea canaliculata*: Diversity, origin and characterization". *Plos One* 8(6): e66689.
- GIRAUD-BILLOUD, Maximiliano, **VEGA Israel A.**, WUILLOUD, Rodolfo G. & CASTRO-VAZQUEZ Alfredo (2013) Imposex and novel mechanisms of reproductive failure induced by tributyltin (TBT) in the freshwater snail *Pomacea canaliculata* *Environmental Toxicology & Chemistry (en prensa)*.
- **VEGA Israel A.**, ARRIBÉRE María A., ALMONACID Andrea V., RIBEIRO GUEVARA Sergio & CASTRO-VAZQUEZ Alfredo (2013) "Apple snails and their endosymbionts bioconcentrate heavy metals and uranium from contaminated drinking water. *Environmental Science and Pollution Research* 19(8):3307-3316.
- CUETO, Juan A., **VEGA Israel A.** & CASTRO-VAZQUEZ Alfredo (2012) Multicellular spheroid formation and evolutionary conserved behaviors of apple snail hemocytes in culture. *Fish and Shellfish Immunology* 34: 443-453.
- GIRAUD-BILLOUD, Maximiliano, **VEGA Israel A.**, ABUD María A, RINALDI TOSI Martín & CASTRO-VAZQUEZ Alfredo (2012) Antioxidant and molecular chaperone defenses during estivation and arousal in the South American apple-snail *Pomacea canaliculata*. *Journal of Experimental Biology* 216: 614-622.
- **VEGA Israel A.**, DELLAGNOLA Federico A., HURST Jorge A., GODOY Martín S. & CASTRO-VAZQUEZ Alfredo (2012) A study of chlorophyll-like and phycobilin pigments in the C endosymbiont of the apple snail *Pomacea canaliculata*". *Biocell* 36(2): 47-95.
- GIRAUD-BILLOUD, Maximiliano, ABUD María A, CUETO Juan A., **VEGA Israel A.** & CASTRO-VAZQUEZ, Alfredo (2011) Uric acid deposits and estivation in the invasive apple-snail, *Pomacea canaliculata*. *Comparative Biochemistry and Physiology A* 158: 506-512.
- CUETO Juan A, GIRAUD-BILLOUD Maximiliano, **VEGA Israel A.** & CASTRO-VAZQUEZ Alfredo (2011) Haemolymph plasma constituents of the invasive snail *Pomacea canaliculata*

(Caenogastropoda, Architaenioglossa, Ampullariidae). *Molluscan Research* 31 (1): 57-60.

- BIGATTI, Gregorio; GIRAUD-BILLOUD, Maximiliano; **VEGA, Israel A.**, PENCHASZADEH, Pablo & CASTRO-VAZQUEZ, Alfredo (2011) The calcareous egg capsule of the Patagonian Neogastropod *Odontocymbiola magellanica*: morphology, secretion and mineralogy. *Journal of Molluscan Studies* 76 (3): 279-288.
- GIRAUD-BILLOUD, Maximiliano; KOCH, Eduardo, **VEGA, Israel A.**, GAMARRA-LUQUES, Carlos & CASTRO-VAZQUEZ, Alfredo (2008) Urate cells and tissues in the South American apple snail *Pomacea canaliculata*: evidence for urate storage and mobilization. *Journal of Molluscan Studies* 74 (3) 259:266.
- **VEGA, Israel A.**; GIRAUD-BILLOUD, Maximiliano; KOCH, Eduardo; GAMARRA-LUQUES, Carlos & CASTRO-VAZQUEZ, Alfredo (2007) Uric acid accumulation within intracellular crystalloid corpuscles of the midgut gland in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae)". *The Veliger* 48(4):276-283.
- **VEGA, Israel A.**, DAMBORENEA, Cristina, GAMARRA-LUQUES, Carlos, KOCH, Eduardo & CASTRO-VAZQUEZ, Alfredo 2006 Facultative and obligate symbiotic associations of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *Biocell* 30 (2):367:375.
- GAMARRA-LUQUES, Carlos, **VEGA, Israel A.**, WINIK, Beatriz, CATALÁN, Marta & CASTRO-VAZQUEZ, Alfredo 2006 An integrative view to structure, function, ontogeny and phylogenetical significance of the male genital system in *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae)". *Biocell* 30 (2):345:357
- **VEGA, Israel A.**, GAMARRA-LUQUES, Carlos, KOCH, Eduardo, BUSSMANN, Leonardo, CASTRO-VAZQUEZ, Alfredo 2005 Pigmented corpuscles isolated from the midgut gland of the apple-snail *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae): DNA content and extent of gland occupancy". *Symbiosis* 39: 37-45.
- Koch¹, Eduardo, **VEGA¹, Israel A.**, ALBRECHT, Eduardo, Ortega, Hugo H. & Castro-Vazquez, Alfredo. 2006 A light and electron microscopic study of pigmented corpuscles in the midgut gland and faeces of *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae). *The Veliger* 48(1): 17-25).

[1These authors have contributed equally to this work]

- GAMARRA-LUQUES, Carlos, **VEGA, Israel A.**, KOCH, Eduardo & CASTRO-VAZQUEZ, Alfredo 2004 Intrahost distribution and transmission of a new species of cyclopoid copepod endosymbiotic to a freshwater snail, *Pomacea canaliculata* (Caenogastropoda, Ampullariidae) from Argentina". *Biocell* 28 (3): 155-164).
- CASTRO-VAZQUEZ, Alfredo, ALBRECHT, Eduardo, **VEGA, Israel A.**, KOCH, Eduardo, GAMARRA-LUQUES, Carlos. "Pigmented corpuscles in the midgut gland of *Pomacea canaliculata* and other neotropical apple-snails (Prosobranchia, Ampullariidae): A possible symbiotic association". *Biocell*. (2002, 26 (1): 101-109. IF2011: 0.63.

Experiencia Previa

1996-1997 Becario alumno de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional de San Luis. 1999-2001 Becario del Fondo para el Mejoramiento de la Calidad Universitaria. Secretaría de Políticas Universitarias, Ministerio de Educación de la Nación. 2001-2004 Jefe de

Trabajos Prácticos en Fisiología. Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. 2001-2005 Becario de Investigación del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). 2004-2013 Profesor Adjunto, Área de Fisiología Normal, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. 2006-2009 Profesor a cargo de la Escuela de Ayudantes de Fisiología. Facultad de Ciencias Médicas. Universidad Nacional de Cuyo. 2006-2007 Becario Posdoctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina. 2007-2013 Investigador Asistente de la Carrera de Investigador Científico y Tecnológico (CONICET).

Integrante Cristian Rodriguez

Nombre	Cristian Rodriguez
Tipo y Número de Documento	DNI: 34257606
CUIL	20-34257606-1
Domicilio Particular	Los Aromos 937, B° Decavial, Godoy Cruz, Mendoza
e-mail	rodriguezci.cb@gmail.com
Fecha de Nacimiento	1989-02-12
Horas Semanales Dedicadas a la Investigación	10 horas
Cargo	Ayudante de primera
Institución	Universidad Nacional de Cuyo
Lugar de Trabajo	Instituto de Fisiología
Categoría de Investigador	No Posee
Grado Académico	Universitario
Disciplina Profesional	Biólogos
Gradp de Formación	Becario de Posgrado
Fecha de Alta en el Proyecto	2013-12-01
Fecha de Baja en el Proyecto	

Libros Publicados

Capítulos de Libros Publicados

Publicaciones en Revistas

Lung structures for gas exchange and hemopoiesis in *Pomacea canaliculata* (ARCHITAENIOGLOSSA, AMPULLARIIDAE). Rodriguez C, Cueto JA & Castro-Vazquez A. Biocell 35: A205, 2011.

Hemocyte spheroidal aggregates in the kidney and lung of the apple-snail (*Pomacea canaliculata*) after an immune challenge. Rodriguez C, Vega IA, Cueto JA & Castro-Vazquez A. Biocell 36 (3): A113, 2012.

Experiencia Previa

Ha sido ayudante ad honorem de Biología Molecular, Histología Animal y Fisiología Animal en el Instituto de Ciencias Básicas y actualmente ha sido designado como Ayudante de 1ra en el Instituto de Fisiología, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Posee experiencia en trabajo de laboratorio, con antecedentes de investigación y comunicaciones a congresos nacionales e internacionales. Actualmente está realizando su tesis doctoral en PROBIOL, con una beca doctoral tipo I de CONICET, con la temática de estudio propuesta en el objetivo 1 del presente proyecto y está trabajando activamente en la inmunidad de *Pomacea canaliculata* (Ampullariidae).

Integrante Pablo Miguel Giuffrida

Nombre	Pablo Miguel Giuffrida
Tipo y Número de Documento	DNI: 34747072
CUIL	20-34747072-5
Domicilio Particular	Figuroa Alcorta 216, Godoy cruz, Mendoza
e-mail	paplogiuffrida@hotmail.com
Fecha de Nacimiento	1989-09-15
Horas Semanales Dedicadas a la Investigación	10 horas
Cargo	Ayudante de Segunda
Institución	Universidad nacional de Cuyo
Lugar de Trabajo	Instituto de Fisiología
Categoría de Investigador	
Grado Académico	Universitario

Disciplina Profesional	Médicos
Gradp de Formación	Becario Alumno
Fecha de Alta en el Proyecto	2013-12-01
Fecha de Baja en el Proyecto	2015-05-13

Libros Publicados

Capítulos de Libros Publicados

Publicaciones en Revistas

Experiencia Previa

Es alumno avanzado de la carrera de Medicina de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo. Ha sido ayudante ad honorem de Fisiología desde 2010 hasta la actualidad donde ha sido designado como Ayudante de Segunda del Instituto de Fisiología. Ha obtenido beca para Alumnos Avanzados (2012-2013) de la UNCuyo y actualmente posee beca Estímulo a las Vocaciones Científicas del Consejo Interuniversitario Nacional (2013-2014). Se ha desempeñado desde su ingreso a este laboratorio (2011) en el estudio de estrategias de defensa antioxidantes y por HSP ante situaciones hipometabólicas (estivación e hibernación) y trabajará activamente especialmente en el desarrollo del objetivo 2 del presente proyecto (temática de estudio de su actual beca).

Equipamiento Disponible

El Instituto de Fisiología y el Laboratorio de Fisiología del IHEM cuentan con todo el equipamiento necesario para la realización del proyecto.

Equipamiento Solicitado

Descripción	Monto	Porcentaje Aportado
No se solicita equipamiento	\$0	%

Distribución del Subsidio

Porcentajes

Materiales **Viajes** **Servicios** **Equipamiento** **Bibliografía**

60%

10%

20%

0%

10%

Monto Estimado

\$15000

Financiamiento de Otro Origen

Institución	Destino	Monto Acordado
CONICET	Gastos varios del proyecto	\$5500

Disciplinas

Código	Nombre	Especificación
1204	Fisiología	Defensas inmunes y ante estrés oxidativo

Campos de Aplicación

Código	Nombre	Especificación
0724	Enfermedades parasitarias	Prevención de Meningitis Eosinofílica y otras parasitosis

Cronograma de Actividades

Descripción	Número de Mes de Inicio de la Actividad	Número de Mes de Finalización de la Actividad
Objetivo 1: 1.1. Investigar la presencia de células madre (progenitoras hemocitopoyéticas o mesenquimales) circulantes.	1	9
Objetivo 2: 2.1. Completar el estudio de la participación de defensas enzimáticas (CAT, SOD) y no enzimáticas (ácido úrico, glutatión reducido) durante el ciclo actividad-hibernación.	1	6
Objetivo 2: 2.2. Estudiar la participación de chaperonas moleculares (Hsc70, 73 kDa; Hsp70, 72 kDa y Hsp90 durante el ciclo de actividad-hibernación.	6	12

Objetivo 1: 1.2 Investigar el rol de las distintas barreras orgánicas en la respuesta a antígenos (bacterianos y de A. cantonensis).	12	24
--	----	----

Objetivo 1: 1.3. Investigar la formación in vitro de esferoides en respuesta a los antígenos precedentes	12	24
--	----	----

Histórico de Estados


Fecha**Estado**

2013-10-28 13:06:42

Abierto

2013-10-30 09:26:29

Enviado

 Imprimir

Volver